

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LARISSA MORATO LUCIANI RICHTER

DETERMINAÇÃO DO CONTROLE DE QUALIDADE DA PROTEÍNA
PRION CELULAR: ENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA CHIP

CURITIBA

2019

LARISSA MORATO LUCIANI RICHTER

DETERMINAÇÃO DO CONTROLE DE QUALIDADE DA PROTEÍNA
PRION CELULAR: ENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA CHIP

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, pelo Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Adriana Frohlich Mercadante

Área: Patologia

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Richter, Larissa Morato Luciani

Determinação do controle de qualidade da proteína prion celular:
envolvimento da proteína chip. / Larissa Morato Luciani Richter . – Curitiba,
2019.

82 p.: il.

Orientadora: Adriana Frohlich Mercadante

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Proteínas priônicas 2. Doenças Priônicas I. Título II. Mercadante,
Adriana Frohlich III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 616.83

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MICROBIOLOGIA, PARASITOLOGIA E PATOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de LARISSA MORATO LUCIANI RICHTER intitulada: **DETERMINAÇÃO DO CONTROLE DE QUALIDADE DA PROTEÍNA PRION CELULAR: ENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA CHIP**, sob orientação da Profa. Dra. ADRIANA FRÖHLICH MERCADANTE, que após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 27 de Setembro de 2019.

Adriana F. Mercadante
ADRIANA FRÖHLICH MERCADANTE
Presidente da Banca Examinadora

Luíza Helena Gremski
LUIZA HELENA GREMSKI
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Daniela Fiori Gradia
DANIELA FIORI GRADIA
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Tárcio Teodoro Braga
TÁRCIO TEODORO BRAGA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Eloise Pavao Guerra Sloppe
ELOISE PAVAO GUERRA SLOPPE
Avaliador Externo (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, INSTITUTO CARLOS CHAGAS, CURITIBA-PR,)

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela presença invisível, porém constante.

À minha família, **Andreas e Bruno**, que são minha força e incentivo diários. É por vocês que me esforço para fazer o melhor todos os dias.

Aos meus pais, **Altair e Simone**, por todo o amor e sacrifícios. Essa conquista também é de vocês.

À minha orientadora, professora Adriana, "**Adri**", meu referencial na academia e fora dela. Com você aprendi muito mais do que cabe nessas páginas.

Aos professores **Silvio Zanata e Lia Nakao**, pelas discussões científicas sempre bem vindas.

Às amigas do laboratório, **Sze, Silvinha, Ingrid, Karime, Pierina** pelas ajudas providenciais e discussões científicas e não científicas.

A **CAPES** e ao **CNPq**, por financiarem esse trabalho, e ao **Programa de Microbiologia, Parasitologia e Patologia**, pela formação durante esse período da pós-graduação.

A todos que, direta ou indiretamente, colaboraram com esse trabalho.

“Hoje em dia penso que essa é uma das perguntas mais inúteis que um adulto pode fazer a uma criança – O que você quer ser quando crescer? Como se crescer fosse algo finito. Como se a certa altura você se tornasse algo e ponto final”. - **Minha história (Michelle Obama)**

RESUMO

A proteína prion celular, ou PrP^C, é uma glicoproteína extracelular, ancorada na membrana por uma molécula de glicofosfatidilinositol e expressa abundantemente no sistema nervoso central. A conversão de PrP^C para uma isoforma mal dobrada e infecciosa, PrP^{Sc}, é responsável pelo desenvolvimento das doenças espongiformes transmissíveis (TSEs) ou doenças priônicas. Em trabalhos anteriores do nosso grupo foi identificada a interação entre PrP^C e Stub1 (*STIP1 homology and U-Box containing protein 1*), através do sistema de duplo-híbrido em leveduras. Stub1 ou CHIP (*C-terminus of HSC70-interacting protein*) é uma co-chaperona citoplasmática que apresenta atividade ubiquitina E3-ligase que realiza a triagem de proteínas para o dobramento ou degradação e participa de seu controle de qualidade. A interação entre PrP^C e CHIP foi confirmada através de técnicas de *pull-down* e co-imunoprecipitação. Através de ensaios de degradação, indicamos que PrP^C é uma proteína cliente de CHIP, pois esta provoca ubiquitinação em PrP^C. O presente trabalho teve como objetivo principal esclarecer em maiores detalhes a participação de CHIP no controle de qualidade de PrP^C. Através de experimentos de *pull-down*, foi visto que a fração N-terminal de PrP^C não é primordial para que aconteça sua ligação com CHIP, nem com Hsp90 ou STI1, o que sugere que essas interações ocorram pela região C-terminal de PrP^C. Através de experimentos de silenciamento de CHIP e com o uso de uma linhagem celular nocauteada para essa proteína, foi visto que CHIP é capaz de degradar PrP^C. Além disso, experimentos de ubiquitinação sugeriram que a via envolvida nessa modulação seria a via de ubiquitina-proteassomo. Se a conversão de PrP^C para PrP^{Sc} depender desse controle de qualidade, CHIP apresenta-se como um alvo potencial para abordagens terapêuticas nas doenças causadas por prions. Portanto, outro enfoque deste projeto foi investigar se CHIP estaria envolvida na degradação de formas de PrP citosólicas (CytPrP), já que há várias evidências que indicam que essas formas são tóxicas para determinados tipos celulares. O nosso grupo já mostrou que, em ensaios de viabilidade celular, o aumento da expressão CHIP reverte esses efeitos tóxicos de CytPrP. No presente trabalho, tentou-se compreender melhor o mecanismo de proteção de CHIP. Quando utilizamos um plasmídeo capaz de expressar uma forma citosólica de PrP (Cyt-PrP), não foi possível detectar uma interação entre essa forma de PrP e CHIP em ensaios de co-imunoprecipitação. Além disso, Cyt-PrP não foi capaz de ser degradado ou sofrer ubiquitinação por CHIP. Assim é possível que CHIP haja indiretamente sobre essa forma tóxica de PrP ou desempenhe sua atividade de chaperona para exercer o efeito protetor observado. Uma vez que a caracterização do processamento de PrP^C ajuda no entendimento das patologias causadas por prions, esse trabalho poderá auxiliar na evolução de estratégias de tratamento para as TSEs, tendo CHIP como alvo.

Palavras-chave: PrP^C. CHIP. Prion citosólico. Controle de qualidade de PrP^C

ABSTRACT

Cellular prion protein, or PrP^C, is an extracellular glycoprotein, attached to the cell membrane through a glycoposphatidylinositol molecule and mostly expressed in the central nervous system. The conversion of PrP^C to a misfolded and infectious isoform, PrP^{Sc}, is responsible for the development of spongiform transmissible encephalopathies (TSEs) or prion diseases. In previous works of our group, we identified the interaction between PrP^C and Stub1 (STIP1 homology and U-Box containing protein 1) through yeast two hybrid system. Stub1 or CHIP (C-terminus of HSC70-interacting protein) is a cytoplasmic co-chaperone which acts also as an E3-ligase. Therefore, it screens proteins either to their correct folding or degradation, being part of their quality control. The interaction between PrP^C and CHIP was confirmed through pull-down and co-immunoprecipitation assays. We also performed degradation tests and suggested that PrP^C is a client protein of CHIP, since the last causes ubiquitination of PrP^C. The present work aimed to enlighten in details the participation of CHIP in PrP^C quality control. We carried out pull-down assays and saw that the N-terminal fraction of PrP^C is not essential for its interaction with CHIP to happen, nor with Hsp90 and STI1, which suggests that these interactions occur through the C-terminal region of PrP^C. Also, through gene silencing tests and the use of a CHIP knocked out cell lineage, we saw that CHIP is capable of degrade PrP^C. Furthermore, our ubiquitination assays suggested that this modulation happens through ubiquitin-proteasome system. If the conversion of PrP^C to PrP^{Sc} depends of this quality control, CHIP presents itself as a potential target for therapeutic approaches in prion caused diseases. Thus, another approach of this work was to investigate if CHIP would be involved in the degradation of cytosolic forms of PrP (Cyt-PrP), since there is evidence indicating that these isoforms are toxic in certain cell types. Our group has already showed that, in cell viability assays, an increase of CHIP expression is able to reverse the toxic effects of Cyt-PrP. In the present work, we tried to better understand this protection mechanism of CHIP. When we used a plasmid capable of express a cytosolic form of PrP (Cyt-PrP), it was not possible to detect an interaction of this isoform of PrP and CHIP, through co-immunoprecipitation assays. In addition, Cyt-PrP was not degraded nor ubiquitinated by CHIP. This way, it is possible that CHIP acts indirectly on this form of PrP or even plays a chaperone activity to exert the observed protection effect. Once the characterization of PrP^C metabolism helps to understand prion caused maladies, this work can cooperate in the evolution of treatment strategies for TSEs, having CHIP as a target.

Keywords: PrP^C. CHIP. Cytosolic prion. PrP^C Quality control.

LISTA DE SIGLAS

APP – proteína precursora amiloide
CHIP – do inglês, *C-terminus of HSC70-interacting protein*
CHX – cicloheximida
CJD – doença de Creutzfeldt Jakob
CO-IP – co-imunoprecipitação
CPZ - Clorpromazina
DMEM – meio mínimo essencial modificado
DMP – dimetil pimelimidato
DNA – ácido desoxirribonucleico
ER – retículo endoplasmático
ERAD – degradação associada ao retículo endoplasmático
ERp57 – tiol oxirredutase do retículo endoplasmático 57
gp78 – glicoproteína humana 78
GPI – glicofosfatidilinositol
HEK293T – células de rim embrionário humano 293T
His – histidina
Hop – do inglês, *Hsp70/Hsp90 organizing protein*
HRP – do inglês, *horseradish peroxidase*
HSc – do inglês, *heat shock cognate protein*
Hsp – do inglês, *heat shock protein*
iNOS – óxido nítrico sintase induzível
IP – imunoprecipitação
LRP1 – do inglês, *Low density lipoprotein receptor-related protein 1*
MEM – meio mínimo essencial
PBS – tampão salina fosfato
PrP – proteína prion
PrP^C – Proteína prion celular
PrP^{Sc} – proteína prion *scrapie*
PVDF - Polyvinylidene difluoride
RESET - do inglês, *Rapid ER Stress-Induced Export*

RNA – ácido ribonucleico

SDS – dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – do inglês, *SDS polyacrilamide gel electrophoresis*

SFB – soro fetal bovino

siRNA – do inglês, *small interfering RNA*

ST11 – do inglês, stress inducible phosphoprotein 1

Stub1 – do inglês, *STIP1 homology and U-box containing protein 1*

TBST – tampão salino Tris adicionado de Tween 20

TPR – domínios repetidos de tetratricopeptídeos

TSE – doenças espongiformes transmissíveis

VIP36 – proteína integral de membrana vesicular 36

WB – *Western blotting*

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO OU EVIDÊNCIAS DE INTERESSE (JUSTIFICATIVAS)	14
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1PROTEÍNA PRION CELULAR E PRIONS	16
2.1.1 Estrutura e Função	16
2.1.2 Doenças Priônicas	18
2.1.3 Controle de Qualidade de PrP ^C	19
2.1.4 PrPs Citosólicos	21
2.2 STUB1/CHIP	22
2.2.1 Estrutura e função de CHIP	22
2.2.2 Deficiência de CHIP	25
2.2.3 CHIP e doenças relacionadas	25
2.2.4 Relação entre CHIP e STI1	26
3.OBJETIVO GERAL	28
4.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
5.MATERIAIS E MÉTODOS	30
5.1PLASMÍDEOS E ANTICORPOS	30
5.2 LINHAGENS CELULARES	30
5.3 TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS HEK293T	31
5.3.1 Método de Fosfato de Cálcio	31
5.3.2 Método de Lipofectamina	32
5.4 DETERMINAÇÃO DOS DOMÍNIOS IMPORTANTES PARA A INTERAÇÃO ENTRE PRPC E CHIP	32
5.4.1Ensaio de <i>Pull-down</i> com mutantes de deleção de PrP ^C N-terminais	32
5.4.2 <i>Western blotting</i>	33
5.5INVESTIGAÇÃO DE STI1/HOP E HSP90 NA INTERAÇÃO ENTRE PRPC E CHIP	34
5.6 CARACTERIZAÇÃO DO MECANISMO ENVOLVIDO NA DEGRADAÇÃO DE PRP ^C POR CHIP	34
5.6.1 Preparo de Resina Ligada Covalentemente a Anticorpo: <i>Cross-linking</i> com DMP	34

5.6.2 Ensaio de Ubiquitinação e Imunoprecipitação com <i>Beads</i> Magnéticas	35
5.6.2.1 Ubiquitinação	35
5.6.2.2 Imunoprecipitação com <i>beads</i> magnéticas	36
5.7 SILENCIAMENTO DE STUB1/CHIP	37
5.7.1 Transfecção para siRNA	37
5.8 ENSAIOS COM CICLOHEXIMIDA	38
5.9 ENSAIOS UTILIZANDO MUTANTES DE PRP CITOSÓLICOS	39
5.9.1 Co-Imunoprecipitação CHIP - Cyt-PrP	39
5.9.2 Degradação de Cyt-PrP por CHIP	40
5.9.3 Ensaio de Ubiquitinação e Imunoprecipitação com <i>Beads</i> Magnéticas	40
5.9.4 Ensaio de Solubilidade e precipitação em metanol	41
6. RESULTADOS	42
6.1 EXPERIMENTOS COM PRP ^C	42
6.1.1 Determinação dos Domínios de Ligação entre PrP ^C E CHIP – <i>Pull-down</i>	42
6.1.2 Investigação de STI1/Hop e Hsp90 na Interação entre PrP ^C E CHIP – <i>Pull-down</i>	44
6.1.3 Silenciamento de CHIP	46
6.1.4 Efeito do silenciamento de Stub1/CHIP sobre PrP ^C	48
6.1.5 Análise da degradação PrP ^C em Células Nocautes para CHIP	49
6.1.6 Caracterização da Interação entre PrP ^C e CHIP – Ensaio de Ubiquitinação	53
6.2 ENSAIOS COM PRP CITOSÓLICO	56
6.2.1 Investigação da interação entre CHIP e PrP citosólico – Cyt-PrP	56
6.2.2 Ensaios de Degradação	57
6.2.3 Investigação da Ação de CHIP Sobre Cyt-PrP – Ensaio de Ubiquitinação	58
6.2.4 Investigação da Ação de CHIP Sobre Cyt-PrP – Ensaio de Solubilidade e Precipitação em Metanol	60
7. DISCUSSÃO	62
7.1 EFEITO DE CHIP SOBRE PRP ^C	62
7.2 EFEITO DE CHIP SOBRE CYT-PRP	67
8. CONCLUSÃO	72

9.PERSPECTIVAS	73
REFERÊNCIAS	74

1. INTRODUÇÃO OU EVIDÊNCIAS DE INTERESSE (JUSTIFICATIVAS)

A proteína prion celular, ou PrP^C, apresenta-se na sua forma mais abundante como uma glicoproteína ancorada na membrana através de uma molécula de glicofosfatidilinositol (GPI) na face externa da membrana celular. É expressa na maioria dos tecidos e abundante no sistema nervoso central (BENDHEIM *et al.*, 1992)

A conversão da proteína prion celular endógena, PrP^C, para uma isoforma mal dobrada e infecciosa PrP^{Sc} (de *prion scrapie*) é responsável pelo desenvolvimento das doenças espongiformes transmissíveis (TSEs) ou doenças priônicas. Essas desordens neurodegenerativas são fatais e incluem a Doença de Creutzfeldt-Jakob (CJD) em humanos, *scrapie* em ovinos e encefalopatia espongiforme bovina no gado. (BOLTON *et al.*, 1982).

Apesar de extensa pesquisa e do fato de PrP^C ser conservado entre as diferentes espécies, ainda não se chegou a um consenso sobre sua função fisiológica. (LINDEN *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2009); Mesmo assim, várias funções tem sido associadas com PrP^C, dentre elas estresse e comportamento, ciclo de sono-vigília, memória, neuritogênese, neuroproteção e adesão celular. Esses achados sugerem que PrP^C está envolvida em complexos multiproteicos, participando de variados processos celulares, não tendo uma única função específica, mas desempenhando funções diferentes, de acordo com a interação realizada (LINDEN *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2010). Em trabalho realizado anteriormente no nosso grupo, a aluna de mestrado Ana Paula Lappas Gimenez, orientada pela Professora Doutora Adriana Frohlich Mercadante, obteve dez potenciais ligantes para PrP^C, através do sistema de duplo-híbrido em leveduras (GIMENEZ, 2013). A interação entre PrP^C e um desses potenciais ligantes foi abordada no meu trabalho de mestrado, realizado entre 2013 e 2015. Essa interação foi entre a proteína prion celular (PrP^C) e a proteína CHIP. Stub1 (STIP1 homology and U-Box containing protein 1) ou CHIP (C-terminus of HSC70-interacting protein) é uma proteína

citoplasmática membro da família das proteínas E3-ligase que funciona, dentre outras funções, como co-chaperona (BALLINGER *et al.*, 1999; DICKEY *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2013). CHIP faz o controle de qualidade de seus substratos proteicos, por fazer a triagem entre seu dobramento ou degradação, atuando na homeostase celular. (SUN *et al.* 2013).

No meu trabalho de mestrado foi possível confirmar a interação entre PrP^C e CHIP (GIMENEZ *et al.*, 2015). Ainda, nossos dados indicaram que PrP^C pode ser degradada por CHIP e que a via envolvida nessa degradação é o sistema ubiquitina-proteassomo (UPS).

O presente trabalho pretendeu dar continuidade a essa caracterização da interação entre PrP^C e CHIP de uma maneira mais detalhada, através de experimentos para o mapeamento dos domínios de PrP^C envolvidos nessa interação e o uso de células com nenhuma expressão ou expressão reduzida de CHIP para entender melhor o papel dessa proteína na estabilidade de PrP^C

Além disso, já que a conversão para PrP^{Sc} depende desse controle de qualidade de PrP^C, Stub1/CHIP apresenta-se como um alvo potencial para abordagens terapêuticas nas doenças causadas por prions. Dados anteriores do nosso grupo indicaram que CHIP é capaz de reverter o efeito tóxico de uma forma de PrP citosólica. Assim, esse trabalho também teve como objetivo investigar a ação de CHIP sobre essa forma de PrP.

Em linhas gerais, o estudo do processamento de PrP^C e suas possíveis formas citosólicas ajuda a melhor entender as doenças priônicas, além de contribuir para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas em doenças neurodegenerativas, sendo CHIP um alvo potencial para tais abordagens.

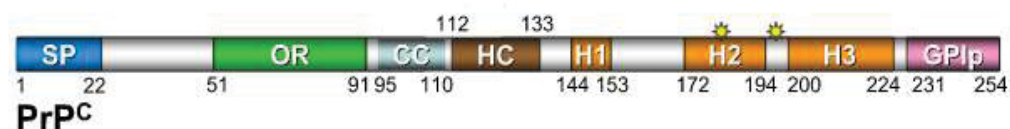
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PROTEÍNA PRION CELULAR E PRIONS

2.1.1 Estrutura e Função

A proteína prion celular, ou PrP^C, é encontrada predominantemente como uma glicoproteína extracelular, ancorada na membrana através de uma molécula de glicofosfatidilinositol (GPI). É expressa na maioria dos tecidos, porém mais abundante no sistema nervoso central (BENDHEIM *et al.*, 1992). A estrutura linear de PrP^C está esquematizada na FIGURA 1.

FIGURA 1 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DA PROTEÍNA PRION MURINA RETRATADA DE FORMA ALONGADA



Os domínios maiores estão mostrados em diferentes cores. SP: peptídeo sinal; OR: domínio de repetição com octapeptídeo; CC: grupamento carregado; HC: núcleo hidrofóbico; H1, H2, H3: domínios helicoidais; GPIp: peptídeo sinalizador da âncora de GPI. Estrelas amarelas indicam a posição dos resíduos de glicosilação, nos aminoácidos 180 e 196.

FONTE: LINDEN *et al.*, 2008.

A conversão da estrutura normal de PrP^C, que apresenta-se predominantemente em forma de alfa-hélice, para uma isoforma que possui estrutura mais abundante em forma de folhas- β - e por isso facilita a formação de agregados compactos, insolúveis e resistentes à proteinase - dá origem a isoforma *scrapie*, ou PrP^{Sc}. Essa forma aberrante serve como molde, que recruta e converte a proteína prion celular em um polímero estruturado de PrP^{Sc}, que tem tendência a acumular principalmente no cérebro (MEYER *et al.*, 1986; revisado por LINDEN *et al.*, 2008; KRAMMER *et al.*, 2009; MABBOT *et al.*, 2018). Essa isoforma alterada compõe, se não exclusivamente, a

maior parte dos *prions* [*proteinaceous infectious particle*], partículas infecciosas transmissíveis, responsáveis pelas encefalopatias espongiformes transmissíveis (TSE), ou doenças priônicas.

A terminologia utilizada para indicar as várias formas da proteína está descrita na TABELA 1.

TABELA 1 – TERMINOLOGIA UTILIZADA PARA PROTEÍNA PRION

Termo	Descrição
PrP	Todas as isoformas de proteína prion, independente de conformação.
PrP^C	Sensível à protease, isoforma celular de PrP, ubiquamente expressa.
PrP^{Sc}/Prion	Resistente à protease, forma de PrP associada à doença, majoritariamente encontrada no SNC e relacionada com infectividade.

FONTE: Adaptado de LAWSON *et al.*, 2005.

Apesar de extensa pesquisa e do fato de PrP^C ser conservado entre as diferentes espécies, ainda não se chegou a um consenso sobre sua função fisiológica. (revisado por LINDEN *et al.*, 2008; MARTINS *et al.* 2009). Algumas evidências apontam que a conversão de PrP^C para a forma PrP^{Sc} implica em um aumento da função tóxica. Entretanto, há também a hipótese de que seja a perda da função de PrP^C a responsável pela patogênese de doenças relacionadas (revisado por LINDEN *et al.*, 2008). Ainda, há evidências que apontam que a susceptibilidade às doenças priônicas pode ser influenciada por inflamação prévia, co-infecção provocada por outros patógenos e envelhecimento (MABBOT *et al.*, 2018). De qualquer forma, o entendimento do papel biológico da proteína pode ajudar a elucidar o mecanismo molecular de doenças priônicas (STEELE *et al.*, 2007).

Estudos realizados em camundongos nocautes (nos quais o gene que codifica para PrP^C foi removido) demonstraram que esses animais são resistentes às doenças causadas por prions (BÜELER *et al.*, 1992; BÜELER *et al.*, 1993), porém desenvolvem-se normalmente, sem maiores alterações fenotípicas. Estudos mais detalhados com esses animais foram capazes de atribuir inúmeras funções à PrP^C, relativas ao estresse e comportamento, ao ciclo sono-vigília e memória, aos

processos de neuritogênese e neuroproteção, de adesão celular, entre outros (revisado por LINDEN *et al.*, 2008). Muitas destas funções foram elucidadas também com a descoberta de ligantes de PrP^C. Esses achados sugerem que PrP^C está envolvida em complexos multiproteicos, participando de variados processos celulares, não tendo uma única função específica, mas desempenhando funções diferentes, de acordo com a interação realizada (revisado por LINDEN *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2010).

2.1.2 Doenças Priônicas

Doenças priônicas ou TSEs (doenças espongiformes transmissíveis) são patologias neurodegenerativas fatais que afetam tanto os humanos quanto outros animais (BOLTON *et al.*, 1982) e podem ocorrer na forma familiar, adquirida ou esporádica. Independentemente da origem, porém, parecem ser transmissíveis sob certas circunstâncias (HEAD *et al.*, 2004).

A maioria dos casos de doenças priônicas humanas ocorre na forma de Creutzfeldt-Jakob esporádica. Apenas 10-15% são associados a mutações no gene PRNP (Creutzfeldt-Jakob genética, Gerstmann-Straussler-Scheinker e insônia familiar fatal). Também podem ocorrer de forma iatrogênica e zoonótica (Creutzfeldt-Jakob iatrogênica e Creutzfeldt-Jakob variante, respectivamente), incluindo o tema no gerenciamento de problemas de saúde pública. Pelo fato de serem extremamente raras (1-2/milhão/ano para Creutzfeldt-Jakob esporádica, por exemplo) e heterogêneas, as TSEs tornam o diagnóstico um desafio, muitas vezes sendo identificadas apenas no *post-mortem*; portanto, uma combinação de abordagens clínica, genética, neuropatológica e bioquímica é necessária (IRONSIDE, *et al.*, 2017).

Diferentes variantes conformacionais de prions já foram descritas e, a diferença entre elas parece estar nos arranjos conformacionais que PrP^{Sc} pode apresentar. Estas partículas infecciosas transmitem esses motivos conformacionais particulares ao PrP^C expresso no hospedeiro,

levando a diferentes fenótipos e patologias (MORALES, 2017). As TSEs compartilham alguns pontos histopatológicos: vacuolização esponfiforme, perda neuronal severa, proliferação astrocítica e da micróglia e acúmulo de *scrapie* no cérebro, podendo apresentar depósitos amiloides. O aparecimento de PrP^{Sc} marca o início das doenças priônicas, e esse PrP mal dobrado tem por natureza a conversão à mais PrP^{Sc} e tendência a agregação, disparando, assim, a neurodegeneração (revisado por ZHU *et al.*, 2013).

Por apresentarem mecanismos similares, o intenso estudo das doenças priônicas acaba revelando mecanismos de neurodegeneração e o comportamento de proteínas mal dobradas também em doenças neurodegenerativas mais comuns, como Parkinson e Alzheimer, auxiliando em estratégias de tratamento (IRONSIDE, *et al.*, 2017).

2.1.3 Controle de Qualidade de PrP^C

Vários estudos sobre as doenças causadas por prions têm procurado esclarecer como alterações na biossíntese e no metabolismo de PrP^C poderiam deflagrar o processo neurodegenerativo (CHAKRABARTI *et al.*, 2009). Como uma típica glicoproteína de superfície celular, durante sua tradução, PrP é translocado para o retículo endoplasmático (ER). O peptídeo sinal N-terminal é então clivado e também ocorre a adição da âncora de GPI após remoção da sequência sinal, na região C-terminal. Ainda no ER, o polipeptídeo de PrP sofre outras modificações pós-traducionais, tais como formação de uma única ponte dissulfeto intramolecular entre duas cisteínas e a adição de oligossacarídeos em dois sítios (resíduos 181 e 197 em humanos e 186 e 196 em camundongos), resultando em uma mistura de moléculas mono-, di- e não-glicosiladas. Ao transitar no Golgi, PrP^C recebe glicosilações adicionais e então, pela via de secreção, é inserida na camada extracelular da membrana plasmática, principalmente nos microdomínios de *rafts* de lipídeos. PrP^C maduro pode ser então endocitado e reciclado para a superfície celular ou enviado para a degradação por lisossomos.

Tipicamente, a biossíntese e transporte de PrP para a superfície celular leva em torno de 30 minutos, e a degradação possui uma meia-vida de 3 a 6 horas (LAWSON *et al.*, 2005; CHAKRABARTI *et al.*, 2009).

Parte das moléculas de PrP recém-sintetizadas podem ser reconhecidas como proteínas mal-dobradas pelo controle de qualidade do ER e ser direcionada à via de degradação associada ao ER (*ER associated degradation – ERAD*). Essa via implica no transporte retrógrado do lúmen do ER para o citosol, remoção dos oligossacarídeos pelas N-glicanases e degradação pelo proteassomo (RESTELLI *et al.*, 2010). Por essa via, várias evidências na literatura indicam que PrP^C sofre ubiquitinação e que é degradado via proteassomo (MA e LINDQUIST, 2001; YEDIDIA *et al.*, 2001).

No que diz respeito à degradação dos prions, os dois maiores complexos de degradação de proteínas celulares - sistema de ubiquitina proteassomo (UPS) e sistema lisossomal- parecem estar envolvidos no metabolismo da proteína (DANTUMA e BOTT, 2014).

Ainda, Krishnan e colaboradores (2014) indicaram, através de experimentos com uma forma mal dobrada de PrP, que proteínas GPI ancoradas e mal dobradas não dependem do ERAD para sua degradação, mas entram numa via secretória que culmina em degradação lisossomal, em situações de estresse de retículo. Essa via de degradação foi chamada de RESET (*Rapid ER Stress-induced Export*). Essa via pode ser importante em processos degenerativos (como as TSEs), que causam a condição de estresse de retículo.

A propósito, no contexto de doenças priônicas, estudos apontaram que há uma desregulação, tanto no sistema ubiquitina-proteassomo, quanto no sistema lisossomal/autofagia, com presença de altos níveis de ubiquitina e de proteínas ubiquitinadas, bem como alta na quantidade de vacúolos autofágicos nas células avaliadas (GOOLD *et al.*, 2014).

2.1.4 PrPs Citosólicos

Apesar de residir principalmente na membrana plasmática, há, durante a biossíntese e metabolismo de PrP, formação de moléculas citosólicas. Estudos demonstraram que condições que favoreciam o dobramento aberrante de PrP, tais como mutações e/ou redução da função do proteassomo, levavam ao acúmulo de PrP citosólicos potencialmente neurotóxicos (MA *et al.*, 2002). Ainda, quando expressos no citosol da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, o PrP desenvolve propriedades “*PrP^{Sc}-like*”, incluindo insolubilidade e resistência relativa à proteinase K (MA e LINDQUIST, 1999).

PrP citosólicos também podem ser gerados por um mecanismo independente de ERAD. Nesse caso, uma parte de população de PrP recém-traduzida falha em ser translocada ao lúmen do ER, ficando no citosol e mantendo o peptídeo sinal N-terminal (FIORITI *et al.*, 2005; ORSI *et al.*, 2006).

Endogenamente, formas de PrP podem ser achadas no citosol de neurônios neocorticais, hipocâmpais e talâmicos, mas são ausentes no citosol de neurônios cerebelares (Revisado por DAS e ZOU, 2016).

Alguns autores indicam que essa forma de PrP é neurotóxica; outros trabalhos contradizem esses achados, mostrando que PrPs citosólicos não são tóxicos (revisado por LINDEN *et al.*, 2008). Há inclusive evidências na literatura que mostram um efeito neuroprotetor dessa forma de PrP em algumas células (RESTELLI *et al.*, 2010).

Com relação ao mecanismo de controle de qualidade de PrP mediado por ERAD, Shao e colaboradores (2014) identificaram a primeira ubiquitina-ligase específica para PrP. Trata-se da gp78, uma proteína integral da membrana do ER, pertencente à família das E3-ligases. Os autores do trabalho em questão demonstraram uma interação específica entre PrP não-glicosilado e gp78, a qual resulta na ubiquitinação e degradação de PrP via proteassomo. Vários trabalhos mostram que uma mesma proteína pode ser substrato para marcação por ubiquitina por múltiplas E3 ligases, o que seria um possível

mecanismo de redundância ou controle regulatório para determinados contextos celulares (MORISHIMA *et al.*; 2008; PARBACUS *et al.*, 2009; LOVE *et al.*, 2012; revisado por EDKINS, 2015). De fato, nosso grupo confirmou, através de publicação na revista Prion a interação entre PrP^C e CHIP, uma co-chaperona com atividade E3 ligase (GIMENEZ *et al.*, 2015). A possível função biológica dessa interação será mencionada a seguir.

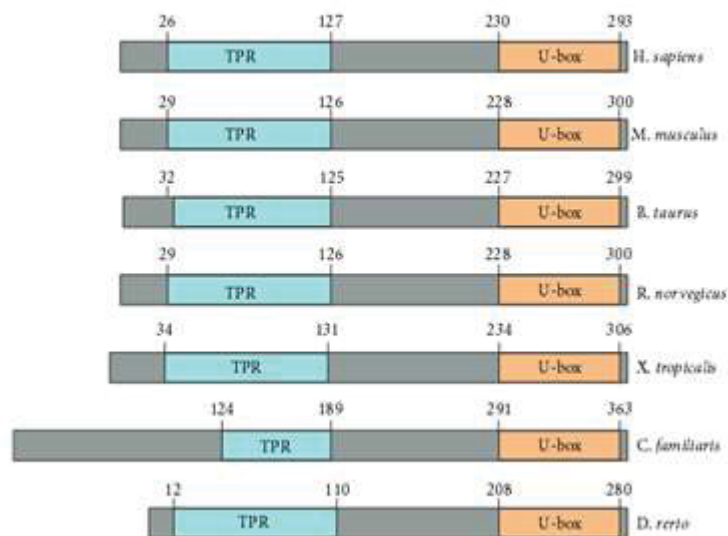
2.2 STUB1/CHIP

2.2.1 Estrutura e função de CHIP

Stub1 (*STIP1 homology and U-Box containing protein 1*) ou CHIP (*C-terminus of Hsc70-interacting protein*), é uma proteína citoplasmática de 35 kDa membro da família das proteínas E3-ligase que funciona como uma co-chaperona (BALLINGER *et al.*, 1999; DICKEY *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2013). Stub1/CHIP é altamente conservada entre as espécies e expressa preferencialmente em músculo estriado adulto e cérebro (BALLINGER *et al.*, 1999). Em mamíferos, o gene que codifica para Stub1/CHIP está localizado no cromossomo 16. Atualmente, o nome Stub1 é utilizado para indicar o gene, e CHIP indica a proteína (revisado por PAUL e GOSH, 2014, JOSHI *et al.*, 2016). Por este motivo, vamos nos referir à proteína somente como CHIP, salvo quando o gene estiver em questão.

Em CHIP, a região amino-terminal possui três domínios de repetições de tetratricopeptídeos (TPR), sendo esses responsáveis por interações com Hsp70/90 e outras chaperonas moleculares (BALLINGER *et al.*, 1999; HATAKEYAMA *et al.*, 2001). A região carboxi-terminal contém o domínio *U-box*, que é o sítio da sua atividade de ubiquitina- E3 ligase e determina a especificidade para ubiquitinação do substrato (HATAKEYAMA *et al.*, 2001). A estrutura de CHIP e comparação com alguns de seus ortólogos está representada na FIGURA 2.

FIGURA 2 - DIAGRAMA ESQUEMÁTICO COMPARANDO OS DOMÍNIOS ESTRUTURAIS DE STUB1/CHIP ENTRE VÁRIAS ESPÉCIES



FONTE: PAUL e GOSH, 2014.

Durante o processo de ubiquitinação, as enzimas E-1 ativam a ubiquitina, através de uma reação ATP dependente, formando uma ligação tioéster em sua extremidade C-terminal. Esta ubiquitina ativada é então transferida para um resíduo de cisteína de uma enzima E-2. As enzimas E-3, por sua vez, são responsáveis pelo último passo da cascata de ubiquitinação, catalizando a transferência de ubiquitina da enzima E-2 para o grupamento amino de um resíduo de lisina do substrato, de forma covalente (ARAVIND e KOONIN, 2000; revisado por METZGER *et al.*, 2012).

Esta propriedade combinada de funcionar como co-chaperona molecular e ubiquitina ligase permite a CHIP fazer uma triagem: redobrar proteínas mal dobradas, juntamente às suas chaperonas, incluindo Hsc70, Hsp70 e Hsp90 - ou, se os danos forem irreparáveis, ubiquitinar a proteína-alvo mal dobrada, marcando-a para degradação via proteassomo (CONNELL, *et al.*, 2001; HATAKEYAMA *et al.*, 2001; revisado por RANEK *et al.*, 2017).

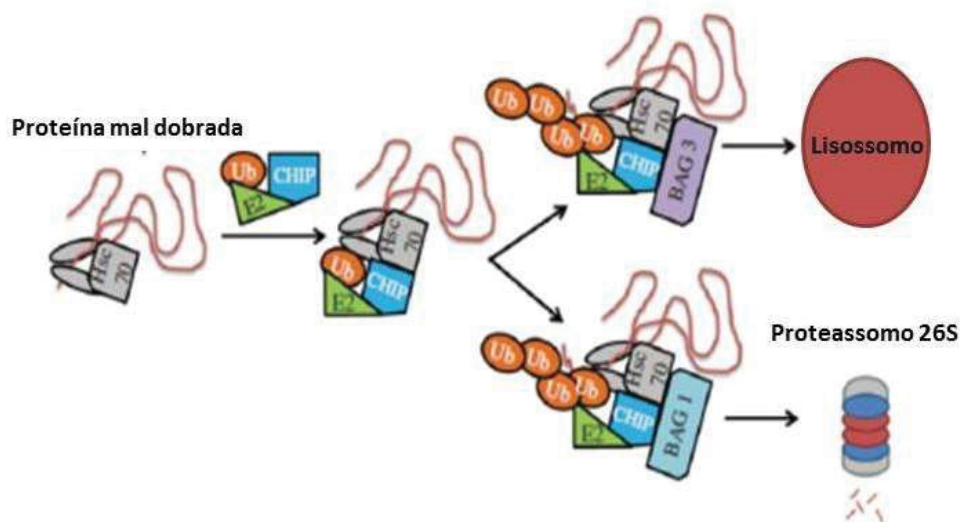
Além da função de E3-ligase, Rosser e colaboradores (2007) indicam um papel intrínseco de chaperona atribuído a CHIP, principalmente sob estresse térmico. Nessa condição, CHIP seria capaz

de reconhecer proteínas em sua estrutura não nativa, ajudando na seleção dessas proteínas mal dobradas para ubiquitinação.

CHIP também está envolvida com o processo de autofagia, outra via pela qual promove degradação de seus substratos, promovendo a homeostase e mantendo o balanço das proteínas celulares. Neste contexto, CHIP e Hsp70 estão juntas, promovendo a degradação de proteínas como tau, alfa-sinucleína e receptor do hormônio de crescimento, por exemplo. Interessante é citar que, para um mesmo substrato, CHIP pode atuar ubiquitinando e o mandando para degradação proteassomal e/ou promovendo a autofagia (através de proteólise lisossomal) conforme a necessidade, para reduzir o fardo proteotóxico celular (revisado por JOSHI, 2016).

A interação de CHIP com seus substratos e possíveis desfechos dados a eles estão ilustrados na FIGURA 3.

FIGURA 3 - TRIAGEM DE PROTEÍNAS PARA DEGRADAÇÃO LISSOSSOMAL OU PROTEASSOMAL POR CHIP



FONTE: Adaptado de RANEK *et al.*, 2017.

2.2.2 Deficiência de CHIP

Com relação à importância da expressão de CHIP, no trabalho de Dai e colaboradores, camundongos nocaute para Stub1/CHIP mostraram-se viáveis e desenvolveram-se normalmente, indicando que a expressão dessa proteína não é essencial. Porém, houve maior mortalidade perinatal de animais nocautes, se comparados aos animais selvagens. A mortalidade perinatal foi relacionada à maior sensibilidade à temperatura nesses camundongos, e a indução de estresse provocou apoptose em múltiplos órgãos, relacionando assim CHIP com resposta ao estresse (DAI *et al.*, 2003). Em outro estudo, camundongos Stub1-/- apresentaram fenótipos de envelhecimento precoce e diminuição de 60% da sobrevivência, sugerindo que CHIP é um regulador no envelhecimento de mamíferos (MIN *et al.*, 2008). Dados publicados apontam que a deficiência de CHIP resulta em diminuição da expectativa de vida e oxidação lipídica profunda, bem como baixa performance na função motora e aumento da ansiedade. Tais observações apontam que CHIP desempenha um papel que vai além do cerebelo, e mutações na proteína podem causar uma doença degenerativa multidimensional e multissistêmica (HAYER *et al.*, 2017).

2.2.3 CHIP e doenças relacionadas

Alguns estudos mostraram o envolvimento de CHIP em doenças neurodegenerativas relacionadas ao dobramento incorreto de proteínas e formação de agregados, como as doenças de Parkinson e Alzheimer (IMAI *et al.*, 2002; DICKEY *et al.*, 2007). Kumar e colaboradores (2007) identificaram a interação entre CHIP e a proteína precursora de amiloide (APP) e mostraram que, em conjunto com as Hsps (proteínas de choque térmico), CHIP participa da maquinaria responsável por diminuir os níveis do peptídeo A β 42 e promover, portanto, um papel neuroprotetor. Ainda, Al-Ramahi e colaboradores (2006) apontaram para o fato de CHIP evitar a neurotoxicidade causada pela proteína Ataxina-1,

promovendo sua ubiquitinação e degradação. A proteína ataxina-1 expandida causa a ataxia cerebelar e provoca o surgimento de inclusões nucleares. Mais uma vez, é apontado o papel neuroprotetor de CHIP.

É fato que as doenças priônicas também são doenças neurodegenerativas caracterizadas pelo dobramento incorreto e agregação de proteínas. Assim, é coerente supor que PrP^C seja um substrato para CHIP. Essa possibilidade é mencionada por Zhang e colaboradores, em um trabalho que discorre sobre a interação realizada entre Hsp70 e PrPs citosólicos mutantes. Os autores identificaram degradação de PrPs através da superexpressão de Hsp70, que exerce, assim, um papel protetor. Ao final da discussão, sugerem que essa conversão da função de Hsp70 de dobramento a um fator de degradação de proteínas possa ser mediado por CHIP. (ZHANG *et al.*, 2012). Corroborando essa hipótese, nosso trabalho anterior indicou que CHIP está envolvida no controle de qualidade de PrP^C, por provocar degradação nesta proteína, possivelmente pela via-ubiquitina-proteassomo (RICHTER, 2015).

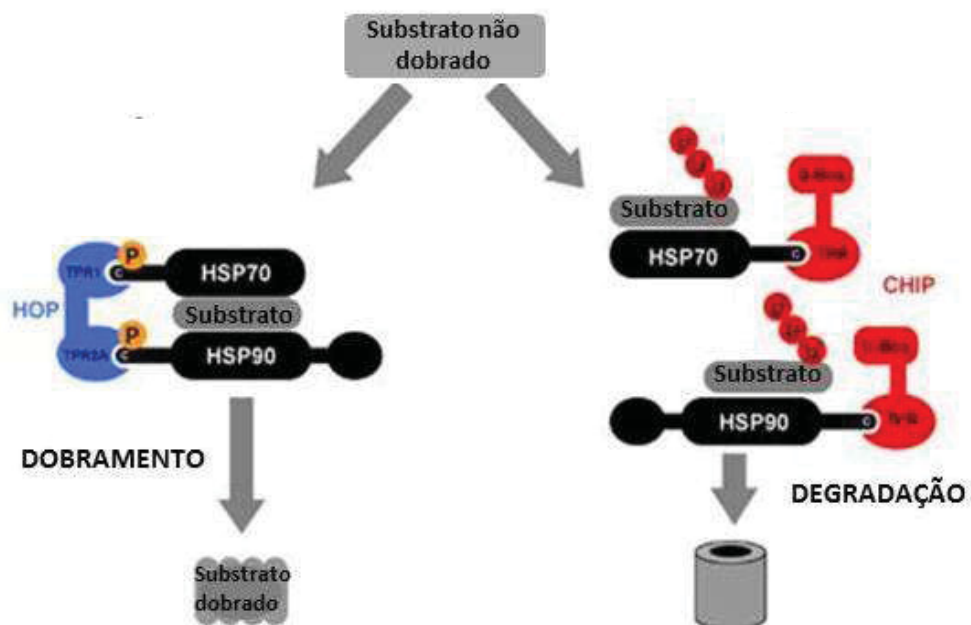
Se a conversão de PrP^C para sua forma infectante, PrP^{Sc}, depender desse controle de qualidade, CHIP pode ser um alvo potencial para abordagens terapêuticas nas doenças causadas por prions.

2.2.4 Relação entre CHIP e STI1

Ainda sobre CHIP, sabe-se que esta é homóloga à proteína STI1 (*stress-inducible protein 1*) ou Hop (*Hsp70/Hsp90 organizing protein*). STI1/Hop também é uma co-chaperona que contém domínios TPR e interage com a região C-terminal de Hsp70 e Hsp90. Além disso, assim como CHIP, interage com PrP^C. (ZANATA *et al.*, 2002). Estudos indicam que STI1/Hop pode ser secretada no meio extracelular (LIMA *et al.*, 2007; HAJJ *et al.*, 2013) e que sua interação com PrP^C na superfície celular está envolvida nos processos de neuritogênese e neuroproteção (CHIARINI *et al.*, 2002; ZANATA *et al.*, 2002; LIMA *et al.*, 2007).

Alguns trabalhos têm demonstrado que STI1/Hop e CHIP podem participar juntos na modulação do equilíbrio entre o dobramento e a degradação de proteínas clientes de Hsp70/90 (KUNDRAT e REGAN, 2010; MULLER *et al.*, 2013). Mais especificamente, um estudo realizado por Muller e colaboradores mostrou que a fosforilação da região C-terminal de Hsp90 e Hsp70 impede a ligação de CHIP e aumenta sua ligação ao STI1/Hop, permitindo o dobramento de proteínas. Do contrário, quando estas chaperonas não estão fosforiladas, elas preferencialmente se ligam em CHIP, promovendo assim a degradação de proteínas alvo (MULLER *et al.*, 2013), FIGURA 4. Presume-se que um mecanismo semelhante esteja envolvido no controle de qualidade de PrP^C, uma vez que esta se liga tanto a STI1/Hop, quanto a CHIP. Esta regulação da estabilidade de PrP^C por STI1/Hop e CHIP foi um dos objetivos do trabalho em questão.

FIGURA 4 - BALANÇO ENTRE DOBRAMENTO E DEGRADAÇÃO



A fosforilação C-terminal de Hsp70 e Hsp90 em células proliferativas aumenta a afinidade por Hop. As chaperonas não-fosforiladas ligam-se preferencialmente a CHIP, que faz a degradação de seus substratos.

FONTE: Adaptado de MULLER *et al.*, 2013.

3. OBJETIVO GERAL

Determinar os mecanismos envolvidos no controle de qualidade da proteína prion celular, no que diz respeito à participação de CHIP.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Mapear os domínios de interação de PrP^C envolvidos em sua ligação com CHIP;
- Avaliar a participação da proteína STI-1 (*Stress inducible protein 1*) e de Hsp90 nos mecanismos relacionados à interação PrP^C-CHIP;
- Caracterizar o mecanismo envolvido na modulação da estabilidade de PrP^C por CHIP, através de ensaios de silenciamento de Stub1/CHIP por RNA de interferência, e do uso de linhagens de células nocautes para CHIP;
- Caracterizar o mecanismo envolvido na degradação de PrP^C por CHIP, através de ensaios de ubiquitinação;
- Verificar a existência de interação entre CHIP e prion citosólico (Cyt-PrP);
- Verificar uma possível ação de CHIP sobre Cyt-PrP;

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ANTICORPOS E PLASMÍDEOS

Os seguintes anticorpos primários foram utilizados neste estudo: soro anti-PrP^C policlonal, feito no Laboratório de Neurobiologia, obtido como descrito por Zanata e colaboradores (2002); Anti-PRNP Therapeutic Antibody (D18) (MRO-944LC) Creative Biolabs; anti-CHIP monoclonal (ABCAM); anti- β -actina monoclonal (Sigma-Aldrich); anti-vinculina monoclonal (Sigma-Aldrich); soro anti-STI1 policlonal produzido no Laboratório de Neurobiologia, segundo o descrito por Souza *et al.* (2014); anti-Hsp70 (BD); anti-his tag policlonal (QIAGEN); anti-GFP, cedido gentilmente pelo Professor Dr. Stênio Perdigão Fragoso do Instituto Carlos Chagas – ICC-Fiocruz Curitiba; anti-ubiquitina monoclonal (*Cell Signaling*).

Anticorpos secundários: anti-*mouse* HRP (Sigma A4416); anti-*rabbit* HRP (Sigma A0545); anti-*human* (Thermo Fischer 31122).

Os plasmídeos utilizados nas transfecções de células foram: pcDNAMyc-CHIP, capaz de expressar CHIP murina, produzido no Laboratório de Neurobiologia pelo aluno Celso Fávaro Júnior; pEGFP-PrP^C e pEGFP-PrP^{C*} (chamado no presente trabalho de Cyt-PrP), que apresentam a sequência capaz de codificar a sequência inteira e o fragmento 23-254 do PrP^C murino, respectivamente no vetor pEGFP-C1, previamente descrito por Lee *et al.* (2001) e cedido gentilmente pela Dra. Vilma Regina Martins (Centro Internacional de pesquisa do Hospital A.C. Camargo, São Paulo); PrP^C-WT pHU-Ubiquitina, gentilmente cedido pela Dra. Ana Lucia Moraes Giannini (UFRJ); pEGFP; pcDNA 3.1-Myc.

5.2 LINHAGENS CELULARES

Para os diferentes experimentos deste trabalho, foram utilizadas as seguintes linhagens celulares:

- Células HEK293T (rim embrionário humano); ATCC® CRL-11268™

- Células Neuro-2a/N2a selvagens (neuroblastoma murino); ATCC® CCL-131™
- Células N2a nocautes para CHIP, linhagem 1.3, produzidas pelo método de CRISPR-CAS9, pela Profa. Dra. Adriana Mercadante, na *Boston University*.

5.3 TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS HEK293T

5.3.1 Método de Fosfato de Cálcio

No método de transfecção por fosfato de cálcio, células HEK 293T foram cultivadas em meio MEM (meio mínimo essencial, Cultilab) adicionado de 10% SFB (Gibco) e 50 µg/mL de antibiótico Gentamicina e mantidas em incubadora úmida com tensão de 5% de CO₂ a 37°C. As células foram transfectadas 24 horas após seu repique, com o plasmídeo de interesse pelo método da co-precipitação de fosfato de cálcio (SAMBROOK, 1998). O plasmídeo de interesse (12 µg) foi adicionado na superfície de 750 µl de água ultrapura estéril, seguido de 250 µl de solução 1 M CaCl₂ e 1000 µl de solução BBS2x concentrada (50 mM BES, 250 mM NaCl e 1 mM Na₂HPO₄; pH 6,95). Após cinco minutos de incubação a temperatura ambiente, foram adicionados 8,0 mL de meio MEM acrescido de 10% de soro fetal bovino e 50 µg/mL de gentamicina. Uma placa de poliestireno de 100 mm de diâmetro (Nest) contendo células HEK293T com aproximadamente 80% de confluência teve seu meio de cultura retirado e então, a solução de transfecção descrita acima foi gentilmente adicionada. Com essa solução, a placa foi incubada por um período de 5 a 8 horas em estufa úmida a 37°C com 5% CO₂. Após este tempo, o meio foi retirado, a placa foi cuidadosamente lavada com 5,0 mL de PBS e adicionado novo meio MEM acrescido de 10% de SFB e 40 µg/mL de gentamicina.

5.3.2 Método de Lipofectamina

No método de transfecção por Lipofectamina 2000® (Thermo Fisher Scientific), células N2a foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* com alta glucose (Gibco), suplementado com piruvato e aminoácidos essenciais (Gibco) e adicionado de 10% SFB (Gibco) e 50 µg/mL de antibiótico Gentamicina ou Penicilina e Estreptomicina e mantidas em incubadora úmida com tensão de 5% de CO₂ a 37°C. As células foram transfectadas 24 horas após seu repique, com o plasmídeo de interesse. Para cada condição de transfecção, foi preparado um tubo contendo meio mínimo essencial e o plasmídeo em questão, e outro tubo com meio mínimo essencial, mais quantidade otimizada do reagente lipofectamina. O conteúdo dos dois tubos foi misturado e adicionado à placa contendo as células, que teve seu meio retirado e trocado por meio de manutenção das células, sem antibiótico.

5.4 DETERMINAÇÃO DOS DOMÍNIOS IMPORTANTES PARA A INTERAÇÃO ENTRE PRPC E CHIP

5.4.1 Ensaios de *Pull-down* com mutantes de deleção de PrP^C N-terminais

Para mapeamento dos domínios importantes na interação entre PrP^C e CHIP, foram realizados ensaios de *pull-down*, baseados no protocolo estabelecido por Costa *et al.* (2009). Brevemente, aproximadamente 10⁶ células HEK293T foram transfectadas através do método de fosfato de cálcio, com 12µg de plasmídeo pMyc-CHIP. Os homogenatos foram clarificados através de incubação com 30 µL de resina de níquel-agarose, adicionados de tampão A (10 mM TRIS-HCl pH 7,4; 100 mM NaH₂PO₄; 25 mM imidazol; 1% NP-40) durante uma hora a 4°C sob agitação. Após essa incubação, as amostras foram centrifugadas por um minuto a 2400 x g e o sobrenadante resultante incubado em 30 µL de resina de níquel-agarose por mais uma hora a 4°C sob agitação. Após essa etapa, as amostras foram mais uma vez

centrifugadas a 2400 x g por 1 minuto e o sobrenadante resultante dividido em duas alíquotas iguais. Uma alíquota foi incubada com 90 µg de PrP^C recombinante (selvagem – WT, ou mutantes de deleção – PrPΔ51-90; PrPΔ105-119; PrPΔ120-125), com cauda de histidina (His₆-PrP^C) e a outra (controle) foi incubada com o volume equivalente de tampão A. Essa incubação foi realizada a 4°C por duas horas, sob agitação. Após esse período, as amostras foram incubadas com mais 30 µL de resina de níquel agarose, por uma hora a temperatura ambiente. Após seis lavagens com tampão A e uma última lavagem com tampão A acrescido de 0,01% de SDS, os materiais que permanecem ligados à coluna foram eluídos em tampão de amostra de Laemmli (LAEMMLI, 1970), submetidos à eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e analisados por *western blotting*.

5.4.2 *Western blotting*

Nesse processo, as proteínas que foram separadas durante a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida são transferidas para uma membrana de polivinilideno difluorado (PVDF) Hybond-P GE Healthcare ou nitrocelulose, durante duas horas, sob voltagem constante de 100 V em sistema de tanque. Após a transferência, a membrana foi bloqueada durante uma hora com tampão TBST (150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,4 e 0,05% Tween 20) contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé). A membrana foi incubada com os anticorpos de interesse, diluídos em tampão de bloqueio por 16 horas a 4°C sob agitação. Após a incubação, a membrana foi lavada com TBST três vezes durante cinco minutos e em seguida, adicionou - se o anticorpo secundário de interesse. A membrana permaneceu incubando com este anticorpo durante uma hora à temperatura ambiente sob agitação. Um novo ciclo de lavagem foi realizado. No final do processo, a membrana foi incubada com o substrato adequado para a reação quimioluminescente empregando-se o Kit West Pico (Pierce Co.). Filmes de auto-radiograma (Thermo) foram

expostos à membrana em diversos tempos até a visualização das bandas de interesse.

5.5 INVESTIGAÇÃO DE STI1/HOP E HSP90 NA INTERAÇÃO ENTRE PRP^C E CHIP

Por serem ligantes já descritos para PrP^C (ZANATA *et al.*, 2002; MACIEJEWSKI *et al.*; ZHANG *et al.*; 2012 2016), pretendeu -se verificar o papel de STI1/Hop e de Hsp90 na interação entre PrP^C e CHIP. Assim, nos mesmos ensaios de *pull-down* realizados para mapear os domínios importantes para essa interação, as proteínas STI1/Hop foram testadas com anticorpos específicos, na intenção de verificar se fazem parte do complexo proteico PrP^C-CHIP.

5.6 CARACTERIZAÇÃO DO MECANISMO ENVOLVIDO NA DEGRADAÇÃO DE PRP^C POR CHIP

Visando caracterizar o mecanismo envolvido na degradação de PrP^C por CHIP, foi necessário empregar a técnica de imunoprecipitação com *beads* magnéticas, descrita a seguir.

5.6.1 Preparo de Resina Ligada Covalentemente a Anticorpo: *Cross-linking* com DMP

Para a obtenção de uma reação mais “limpa”, fez-se uso da técnica de *cross-linking*, isto é, a utilização de matriz contendo um anticorpo covalentemente ligado a ela, através de um agente *crosslinker*, nesse caso o dimetil pimelimidato (DMP), seguindo o proposto por Harlow e Lane (1998). A matriz usada nesse procedimento foram *beads* magnéticas ligadas à proteína G (Thermo Fisher). Uma alíquota de 50µL da suspensão de *beads* magnéticas foi separada e incubada com o anticorpo de interesse (soro policlonal anti-PrP^C feito em camundongo ou soro pré-imune) durante 2 horas à temperatura ambiente, sob

agitação; concomitantemente e nas mesmas condições, outra alíquota foi incubada com soro pré-imune de camundongo. Após a incubação, a matriz foi centrifugada por 30 segundos a 6000 x g. O sobrenadante foi descartado e a matriz foi coletada e lavada duas vezes com uma solução de borato de sódio 0,2 M pH 9,0. A matriz foi centrifugada por 5 minutos a 6000 x g, o sobrenadante descartado, e então incubada com borato de sódio 0,2 M pH 9,0 acrescido de 20 mM de DMP Sigma-Aldrich (dimetil pimelimidato) por 16 horas a 4°C, sob agitação. Após essa reação, a resina foi lavada duas vezes com borato de sódio 0,2 M pH 9,0. A partir daí, inicia-se um ciclo de lavagens da matriz: a reação de *cross-linking* foi interrompida através de três lavagens de 10 minutos com uma solução de TRIS 100 mM pH 7,4. Depois, realizaram-se mais duas lavagens de 5 minutos com uma solução de glicina pH 3,0. Finalmente, a matriz foi lavada três vezes de 10 minutos com PBS e estocada a 50% numa solução de PBS timerosal 0,01%, para conservação.

5.6.2 Ensaio de Ubiquitinação e Imunoprecipitação com *Beads* Magnéticas

5.6.2.1 Ubiquitinação

O ensaio de ubiquitinação foi adaptado a partir do descrito por Ding e Goldberg (2009). Células N2a foram co-transfectadas com vetores capazes de expressar PrP^C, CHIP e HA-ubiquitina em 6 condições diferentes, conforme TABELA 2. Após 24 horas, as células foram lisadas durante 30 minutos em tampão de lise gelado (50 mM de TRIS-HCl pH 7,4; 1% de NP-40; 0,2% de deoxicolato de sódio; 150 mM de NaCl; 1,0 mM PMSF; 1,0 mM NEM) em banho de gelo e então centrifugadas a 18400 x g durante 15 minutos a 4°C.

TABELA 2 – ESQUEMA DE TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS N2A, PARA REAÇÃO DE UBIQUITINAÇÃO

Plasmídeo	1	2	3	4	5	6
pHA-Ubiquitina (0,5µg)	+	+	+	-	-	+
pcDNAMyc-CHIP (0,5µg)	-	+	+	+	-	+
pEGFP-PrP ^C (1,0µg)	+	+	+	+	+	-
MG132 (10µM)	-	-	+	-	-	-

FONTE: A AUTORA, 2019.

5.6.2.2 Imunoprecipitação com *beads* magnéticas

Conforme o proposto pelo fabricante (Thermo Fisher), a imunoprecipitação com *beads* magnéticas ligadas a proteína G foi realizada da seguinte maneira: a quantidade desejada dos extratos celulares (aproximadamente 250 µg) foi incubada, à temperatura ambiente, com 50 µL da suspensão de *beads* magnéticas já ligadas covalentemente a anticorpo anti-PrP^C, ou a soro pré-imune de camundongo, durante 40 minutos, sob agitação. As matrizes contendo os imunocomplexos ligados foram lavadas três vezes com 200 µL de tampão de lise, e mais uma vez com 100 µL de tampão de lise. O material que permaneceu ligado foi eluído com 25 µL de tampão de amostra Laemmli (LAEMMLI, 1970) não - redutor para SDS - PAGE 2,5x concentrado, fervido a 100°C durante dez minutos, submetido à SDS - PAGE 10% e analisado por *western blotting* com os anticorpos anti-ubiquitina e anti- PrP^C.

5.7 SILENCIAMENTO DE STUB1/CHIP

Para suprimir a expressão de Stub1/CHIP, foram adquiridos 3 siRNAs da Dharmacon®. Dois desses RNAs são da linha ON-TARGET (ON-TARGETplus STUB1 siRNA; targeted region: ORF J-007201-09-0002 e J-007201-10-0002) e o último, também dirigido à região traduzida (Custom siRNA sequência senso 5'-TGCCGCCACTATCTGTGTAAT-3'), retirado do trabalho de Ko e colaboradores (2009). Os siRNAs liofilizados foram ressuspensos e aliquotados segundo protocolo do fabricante.

5.7.1 Transfecção para siRNA

Segundo instruções do fabricante, os siRNAs foram transfectados em células HEK293T ou N2a através do reagente Dharmafect® (GE).

Ambas as linhagens foram plaqueadas em seus meios de cultivo usuais, sem adição de antibiótico. Após 24 horas, as células foram transfectadas com os siRNAs de interesse e uso do Dharmafect®. 48 horas após a transfecção, extratos celulares foram obtidos como descrito no item 4.3.2 e submetidos à SDS-PAGE e *western blotting* com o uso dos anticorpos anti-CHIP e anti- β actina.

5.7.2 Dupla Transfecção para siRNA

Para possibilitar análise do silenciamento de Stub1/CHIP e seu efeito em PrP^C, foi necessário fazer uso de técnica que possibilita transfecção do siRNA juntamente com a transfecção do plasmídeo que superexpressa PrP^C (GFP-PrP^C). Para tanto, fez-se uso do reagente Dharmafect Duo® (GE). Células HEK293T foram co-transfectadas 24 após seu repique em meio completo sem antibiótico, com siRNA de interesse + GFP-PrP^C, segundo instruções do fabricante do Dharmafect Duo®. Após 48 horas, extratos celulares foram obtidos como descrito no

item 5.6.2.1 e submetidos à SDS-PAGE e *western blotting* com o uso dos anticorpos anti-PrP^C, anti-CHIP e anti- β actina.

5.8 ENSAIOS COM CICLOHEXIMIDA

Para avaliar o comportamento da proteína prion diante da interrupção de sua tradução, na presença ou ausência de CHIP, foram realizados experimentos com a cicloheximida, justamente um inibidor da fase de alongamento da tradução proteica, adaptado do experimento proposto por Yang e colaboradores (2013).

Nestes experimentos, células N2a selvagens e nocautes para CHIP foram plaqueadas em placas de 60mm, em quantidade suficiente para que a confluência estivesse entre 80-90%, 24 horas após seu repique. A transfecção das células foi realizada nas seguintes condições (TABELA 3):

TABELA 3 – ESQUEMA DE TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS N2A, PARA EXPERIMENTO COM CICLOHEXIMIDA

Plasmídeo	1	2
PrP ^C – WT (3,0 μ g)	+	+
pcDNA-MyC (2,0 μ g)	+	-
pcDNAMyc-CHIP (2,0 μ g)	-	+

FONTE: A AUTORA, 2019.

- Quantidade de DNA/placa: 5,0 μ g
- Quantidade de lipofectamina/placa: 10 μ L
- Meio de transfecção preparado em optiMEM (500 μ L/tubo - 2 tubos para cada condição: 1 tubo com DNA + 1 tubo com lipofectamina).

Vinte e quatro horas após a transfecção, cada placa foi tratada com tripsina e a suspensão de células dividida igualmente entre 4 placas de 35mm. No dia seguinte, as placas foram tratadas com solução de

cicloheximida (SIGMA C7698) a 100 μ M nas placas. As coletas celulares foram feitas nos tempos 0; 4; 6 e 10h após tratamento com cicloheximida. Os extratos celulares foram então congelados e posteriormente lisados, conforme item 5.6.2.1.

Os extratos foram submetidos à SDS-PAGE 12% e *western blotting*, analisados frente à reação com os anticorpos Anti-PrP^C; Anti-CHIP; Anti- β Actina.

5.8.1 Quantificação das Quantidades Relativas de PrP^C

A análise dos dados obtidos a partir dos experimentos com cicloheximida foi realizada por densitometria das bandas do *western blotting* através do software ImageJ®. A normalização das reações foi realizada com relação à intensidade das bandas de β -actina. Assim, pôde-se avaliar se houve degradação de PrP^C por CHIP, bem como o grau de degradação presente.

5.9 ENSAIOS UTILIZANDO MUTANTES DE PRP CITOSÓLICOS

Visto que CHIP é uma proteína predominantemente citosólica (BALLINGER *et al.*, 1999), pretendeu-se realizar ensaios utilizando mutantes de PrP também citosólicos, para testar se CHIP é capaz de degradar esses mutantes. Assim, o mutante de PrP citoplasmático sem a sequência sinal N-terminal (Cyt-PrP) foi analisado nesse quesito.

5.9.1 Co-Imunoprecipitação CHIP - Cyt-PrP

Este teste foi realizado através de transfecção de células N2a com plasmídeos capazes de expressar transientemente as proteínas CHIP e Cyt-PrP. Após lise celular, os extratos foram submetidos à co-Imunoprecipitação (co-IP), conforme já descrito no item 5.6.2.2.

5.9.2 Degradação de Cyt-PrP por CHIP

Após a co-IP, foram realizados testes de degradação, para avaliar a ação de CHIP sobre Cyt-PrP, baseado no proposto por Ko e colaboradores (2009). No teste de degradação, uma quantidade fixa de Cyt-PrP foi transfectada sozinha ou co-transfectada com Myc-CHIP, tanto em células HEK293T quanto em células N2a, conforme TABELA 4. Após 24 ou 48 horas de cultivo, foram feitos extratos celulares a partir das células transfectadas, conforme item 5.6.2.1. Esses extratos foram então submetidos à SDS-PAGE e analisados por *western blotting* utilizando-se os anticorpos específicos. β -Actina e vinculina foram usadas como o controle de carregamento do *western blotting*.

Assim, pôde-se avaliar se há degradação de PrP mutante por CHIP.

TABELA 4 - ESQUEMA DE TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS HEK293T e N2A PARA ENSAIO DE DEGRADAÇÃO

Plasmídeo	1	2
Cyt-PrP (1,0 μ g)	+	+
pcDNAMyc-CHIP(0,5 μ g)	-	+
pcDNAMyc(0,5 μ g)	+	-

FONTE: A AUTORA, 2019.

5.9.3 Ensaio de Ubiquitinação e Imunoprecipitação com *Beads* Magnéticas

Da mesma forma que para GFP-PrP^C, foi realizado experimento de ubiquitinação utilizando-se o plasmídeo Cyt-PrP, na intenção de avaliar a possível ação de CHIP na via de degradação de Cyt-PrP. Os testes seguiram os mesmos moldes do já descrito no item 5.6.2.1, com a diferença do uso do plasmídeo que expressa prion citosólico, conforme TABELA 5.

TABELA 5 - ESQUEMA DE TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS N2A COM CYT-PRP PARA ENSAIO DE UBIQUITINAÇÃO

Plasmídeo	1	2	3	4	5	6
pHA-Ubiquitina (0,5µg)	+	+	+	-	-	+
pcDNAMyc-CHIP (0,5µg)	-	+	+	+	-	+
Cyt-PrP (1,0 µg)	+	+	+	+	+	-
MG132 (10µM)	-	-	+	-	-	-

FONTE: A AUTORA, 2019.

5.9.4 Ensaio de Solubilidade e precipitação em metanol

O experimento de solubilidade e precipitação em metanol foi adaptado do experimento descrito por Roucou e colaboradores (2003), com o objetivo de avaliar a ação de CHIP sobre a solubilidade de Cyt-PrP. Células N2a foram co-transfectadas com vetores capazes de expressar Cyt-PrP e/ou CHIP. Após 24 horas de expressão, os extratos celulares foram obtidos conforme item 5.6.2.1. Frações sobrenadante e *pellet* foram então separadas e incubadas com 4 volumes de metanol por 16 horas e novamente centrifugados a 10000 x g por 10 minutos a 4°C e os *pellets* resultantes ressuspensos em tampão de Laemmli redutor (LAEMMLI, 1970). Os extratos celulares foram submetidos à SDS-PAGE e analisados por *western blotting* através dos anticorpos anti-PrP^C e anti-CHIP.

6. RESULTADOS

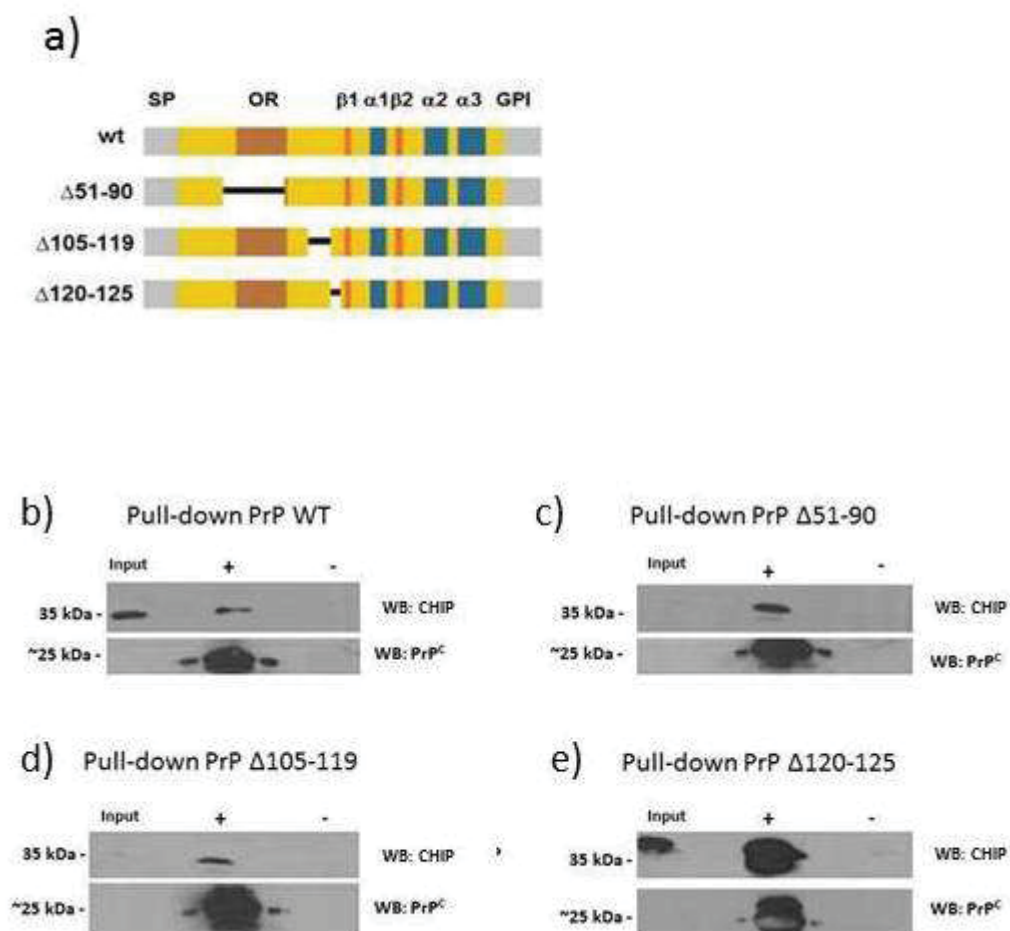
6.1 EXPERIMENTOS COM PRP^C

6.1.1 Determinação dos Domínios de Ligação entre PrP^C E CHIP – *Pull-down*

Para determinação dos domínios participantes da interação PrP^C - CHIP, realizamos ensaios de *pull-down*, para verificar se havia interação entre CHIP e proteínas recombinantes que contêm fragmentos deletados da molécula de PrP^C.

De acordo com a FIGURA 5, pode-se verificar que há interação entre CHIP e todos os mutantes de deleção de PrP^C testados. Isto é, esses fragmentos deletados aparentemente não são primordiais para que essa interação ocorra. A ligação permanece estável e detectável mesmo na ausência dos domínios faltantes ($\Delta 51-90$; $\Delta 105-119$; $\Delta 120-125$).

FIGURA 5 - INTERAÇÃO ENTRE PRP^C E CHIP EM ENSAIOS DE *PULL-DOWN*



(a) Diagrama mostrando o padrão linear da molécula de PrP^C, bem como seus mutantes deletados dos resíduos Δ51-90; Δ 105-119 and Δ 120-125. Extrato de células HEK293T foi incubado com His₆-PrP^C WT (b), His₆-PrP^CΔ51-90 (c), His₆-PrP^CΔ105-199 (d) ou His₆-PrP^CΔ120-125 (e) e Ni-NTA-agarose (+) ou apenas com Ni-NTA-agarose (-). Análises de *western blotting* foram feitas com anticorpo anti-CHIP (painel superior). As membranas também foram reveladas com anticorpo anti-PrP^C para confirmar a recuperação da proteína recombinante na resina (painel inferior). INPUT: lisado celular pré-imunoprecipitação.

WB: *western blotting*.

FONTE: A AUTORA, 2019.

Os mutantes de deleção da proteína prion celular testados neste trabalho são correspondentes a deleções na região N terminal da proteína prion celular, onde estão presentes os seguintes domínios da proteína: região dos aminoácidos 51-90, que corresponde à região de

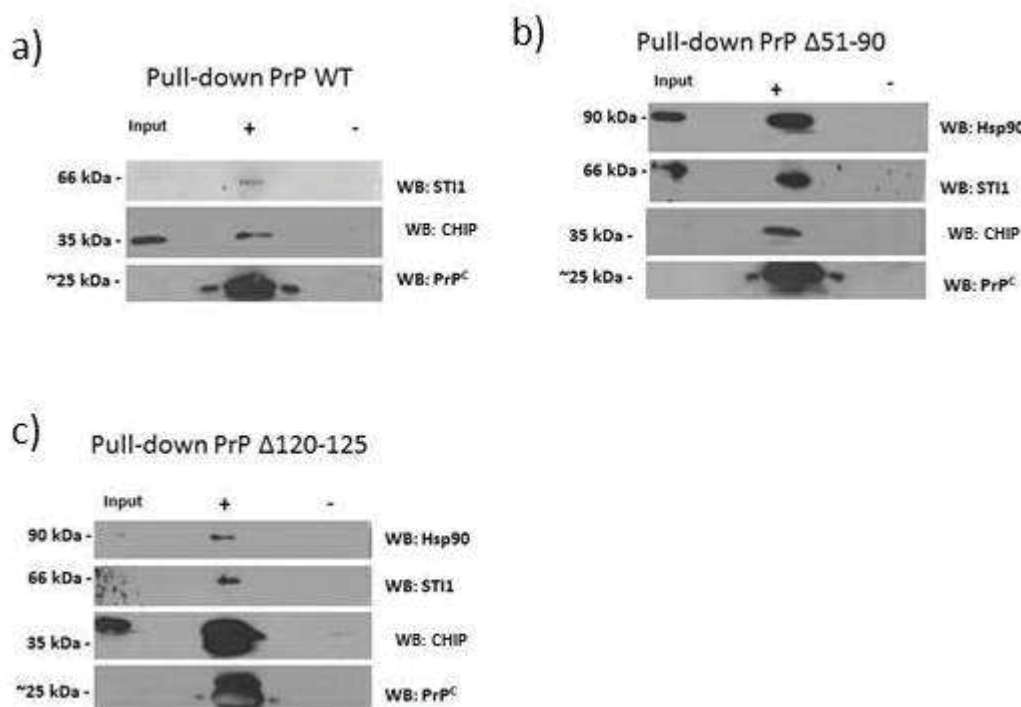
repetição de octapeptídeos; região do fragmento 105-119, que abrange parte do grupamento carregado e parte do núcleo hidrofóbico da proteína; a região dos aminoácidos 120-125 encontra-se dentro do núcleo hidrofóbico (LINDEN *et.al.*, 2008). Interessantemente, a ligação entre PrP^C e CHIP parece não ser dependente desses domínios.

A proteína STI1 é homóloga a proteína CHIP e ligante conhecido para a proteína prion celular, e a ligação a PrP^C dá-se através do seu domínio TPR2a (MACIEJEWSKI *et al.*, 2016). Visto que CHIP também possui esses domínios TPR, é possível que sua interação com PrP^C ocorra via esses domínios. Nesta mesma interação (STI1-PrP^C), o domínio necessário à ligação em PrP^C está entre os resíduos 113-128 (LOPES *et al.*, 2005). No entanto, a mesma porção da molécula parece não ser importante na sua interação com CHIP.

6.1.2 Investigação de STI1/Hop e Hsp90 na Interação entre PrP^C E CHIP – *Pull-down*

Visto que as proteínas STI1 e Hsp90 são ligantes conhecidos para a proteína prion celular (ZANATA *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2012; MACIEJEWSKI *et al.*, 2016), testamos a presença dessas proteínas nos imunocomplexos contendo His₆-PrP^C WT, His₆-PrP^CΔ51-90, ou His₆-PrP^CΔ120-125, da mesma forma antes realizada para CHIP.

FIGURA 6 – PARTICIPAÇÃO DE Hsp90 E STI1 NA INTERAÇÃO ENTRE PRP^C E CHIP EM ENSAIOS DE *PULL-DOWN*



Extrato de células HEK293T foi incubado com His₆-PrP^C WT (a), His₆-PrP^CΔ51-90 (b), ou His₆-PrP^CΔ120-125 (c) e Ni-NTA-agarose (+) ou apenas com Ni-NTA-agarose (-). Análises de *Western blotting* foram feitas com os anticorpos anti-HSP90, anti-STI1 e anti-CHIP. As membranas também foram reveladas com anticorpo anti-PrP^C para confirmar a recuperação da proteína recombinante na resina (painel inferior). INPUT: lisado celular pré-imunoprecipitação.

WB: *western blotting*

FONTE: A AUTORA, 2019.

Como observado na FIGURA 6, foi possível detectar a presença de STI1 em todas as condições, e de Hsp90 nos complexos contendo mutantes de deleção de PrP His₆-PrP^CΔ51-90 His₆-PrP^CΔ120-125. Esse resultado reforça a hipótese de que essas proteínas possam estar juntas, atuando num mesmo processo celular, num imunocomplexo, como o proposto por Muller e colaboradores (2013), e Maciejewski e colaboradores (2016).

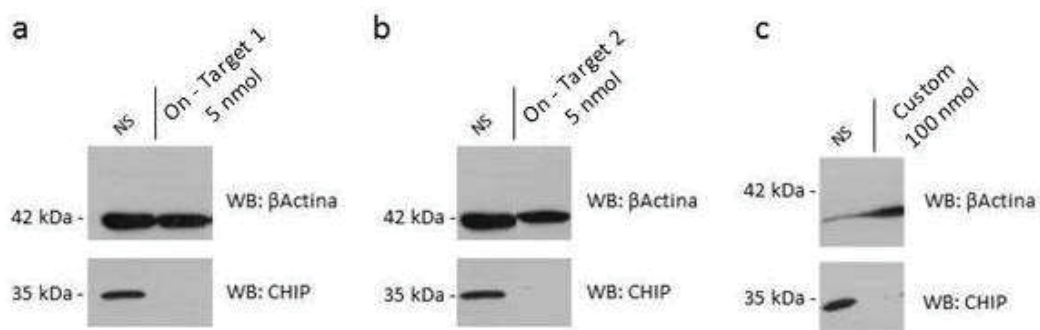
No tocante à região da molécula de PrP^C que se liga a essas proteínas, as mesmas porções proteicas aparentemente irrelevantes para a interação PrP^C-CHIP, parecem também não ter importância para a ligação de chaperonas e STI1. Exclui-se a inespecificidade das

reações, pois não houve detecção de bandas nos controles negativos (extratos celulares incubados com Ni-NTA-agarose) (FIGURA 6).

6.1.3 Silenciamento de CHIP

Para averiguar o impacto da supressão de CHIP endógena sobre os níveis de PrP^C, utilizamos três tipos de siRNAs provenientes da empresa Dharmacon, e testamos suas eficácias em células HEK293T, já que esses RNAs são específicos para células humanas. Dois desses siRNAs são comerciais (ON-TARGET), e um customizado (Custom), segundo o trabalho de Ko e colaboradores (2007). A FIGURA 7 mostra, em células HEK293T, que os dois siRNAs ON-TARGET foram capazes de suprimir completamente a expressão de Stub1/CHIP, utilizando-se apenas 5 nmol de siRNA, em cada situação (FIGURAS 7a e 7b).

FIGURA 7 – CHIP É EFICIENTEMENTE SILENCIADA EM CÉLULAS HEK293T–



Células HEK293T foram transfectadas com o siRNA indicado em a, b e c, em placas de 35mm. Após 48 horas, os lisados celulares foram submetidos à SDS-PAGE e *western blotting* e analisados com o uso dos anticorpos anti-CHIP anti-βactina.

NS: controle não silenciado.

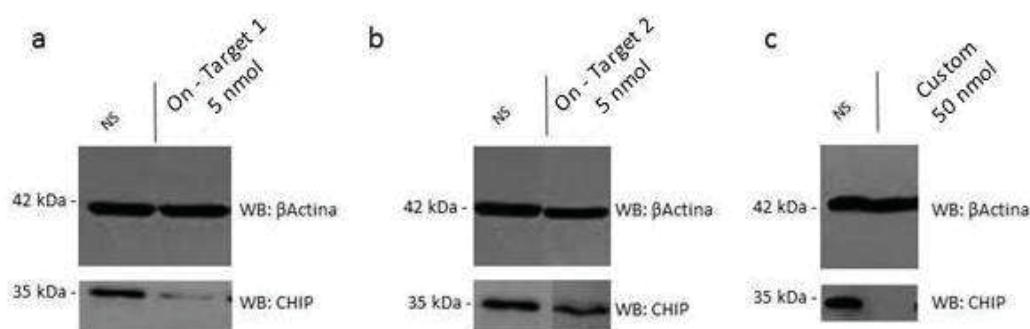
WB: *western blotting*.

FONTE: A AUTORA, 2019.

Para o Custom siRNA, foram necessários 100 nmol de reagente para que Stub1/CHIP fosse silenciada, na mesma linhagem (FIGURA 7c). De qualquer forma, os três reagentes foram bem sucedidos no silenciamento de Stub1/CHIP em células HEK293T.

Os siRNAs adquiridos são específicos para silenciamento de Stub1/CHIP humana. Por isso, nossa primeira escolha foi usar linhagem de células humanas HEK293T. Porém, a sequência do cDNA para essa proteína é altamente conservada entre as espécies (Revisado por PAUL e GOSH, 2014). Assim, testou-se também se os siRNAs disponíveis poderiam ser usados na linhagem neuronal murina N2a. A FIGURA 8 mostra que, apesar de não termos conseguido a mesma eficiência de silenciamento, os siRNAs foram capazes de suprimir em parte a expressão de Stub1/CHIP em N2a. O uso de 5 nmol do plasmídeo ON-TARGET 1 foi capaz de suprimir quase totalmente a expressão de CHIP (FIGURA 8a). O mesmo não ocorreu com o plasmídeo ON-TARGET 2 (FIGURA 8b), nas mesmas condições. Ainda, o siRNA Custom foi eficiente no silenciamento de Stub1/CHIP, quando utilizamos 50 nmol do plasmídeo (figura 8c). De qualquer forma, sob condições padronizadas, concluímos que tanto o siRNA ON-TARGET 1 quanto o siRNA Custom podem ser utilizados no silenciamento de células HEK293T (humana) e N2a (murina).

FIGURA 8 – CHIP É EFICIENTEMENTE SILENCIADA EM CÉLULAS N2A



Células N2a foram transfectadas com o siRNA indicado, em placas de 35mm. Após 48 horas, os lisados celulares foram submetidos à SDS-PAGE e *western blotting* e analisados com o uso dos anticorpos anti-CHIP e anti-βactina.

NS: controle não silenciado.

WB: *western blotting*.

FONTE: A AUTORA, 2019.

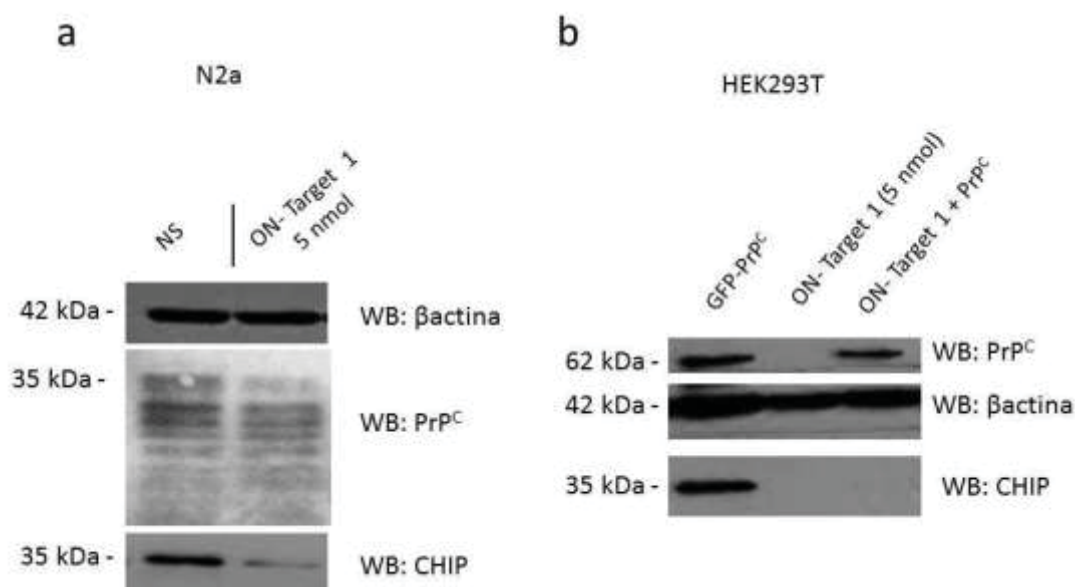
6.1.4 Efeito do silenciamento de Stub1/CHIP sobre PrP^C

Após análise da eficiência dos siRNAs nas linhagens escolhidas, buscamos saber qual o resultado do silenciamento de Stub1/CHIP sobre os níveis de PrP^C, tanto endógeno quanto superexpresso.

Sabendo-se que a linhagem murina N2a apresenta considerável quantidade de PrP^C endógena, e que, para esta linhagem, o siRNA ON-TARGET 1 funcionou satisfatoriamente na supressão de CHIP, testamos qual seria o efeito deste silenciamento sobre os níveis de PrP^C endógeno, como indica a FIGURA 9a.

Além disso, sabemos de experimentos anteriores que células HEK293T apresentam baixa quantidade de expressão de PrP^C endógeno. Portanto, nessa linhagem, testamos efeito do silenciamento de CHIP, adicionado da superexpressão da proteína prion celular, utilizando o plasmídeo GFP-PrP^C, através do reagente lipídico Dharmafect Duo®. (FIGURA 9b).

FIGURA 9 – EFEITO DO SILENCIAMENTO DE STUB1/CHIP SOBRE PRPC



Células N2a (6a) ou HEK293T (6b) foram transfectadas com o siRNA 1 On-Target e/ou plasmídeo GFP-PrP^C como indicado na parte superior das figuras, em placas de 35mm. Após 48 horas, os lisados celulares foram submetidos à SDS-PAGE e *western blotting* e analisados com o uso dos anticorpos anti-CHIP anti-βactina e anti-PrP^C.

NS: controle não silenciado.

WB: *western blotting*.

FONTE: A AUTORA, 2019.

De acordo com a FIGURA 9, em ambas as linhagens não há diferenças visíveis na quantidade de PrP^C (tanto endógena quanto superexpressa), quando se comparam células com CHIP silenciada com células não silenciadas.

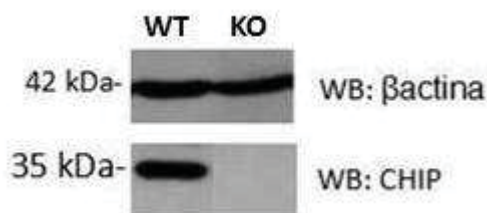
6.1.5 Análise da degradação PrP^C em Células Nocautes para CHIP

Com a intenção de avaliar a degradação de PrP^C na presença ou ausência de CHIP, realizamos ensaios com cicloheximida, que é um inibidor da tradução de proteínas, nos quais foram utilizados células N2a selvagens e células N2a nocautes para expressão de CHIP. O emprego de células N2a nocautes para CHIP exclui o viés da presença de CHIP

endógena na linhagem, além de ser uma ferramenta mais estável que o uso de siRNAs,

Para confirmar a ausência da expressão de CHIP na linhagem celular nocaute, foi realizado o *western blotting* mostrado na FIGURA 10.

FIGURA 10 - EXPRESSÃO DE CHIP EM CÉLULAS N2A SELVAGENS E NOCAUTES



Células N2a selvagens (WT) e a linhagem nocaute para CHIP 1.3 (KO) foram lisadas, submetidas à SDS-PAGE e *western blotting* e analisadas com o anticorpo anti-CHIP. βactina foi usada como controle de carregamento do gel.

WB: *western blotting*.

WT: Wild Type (selvagem)

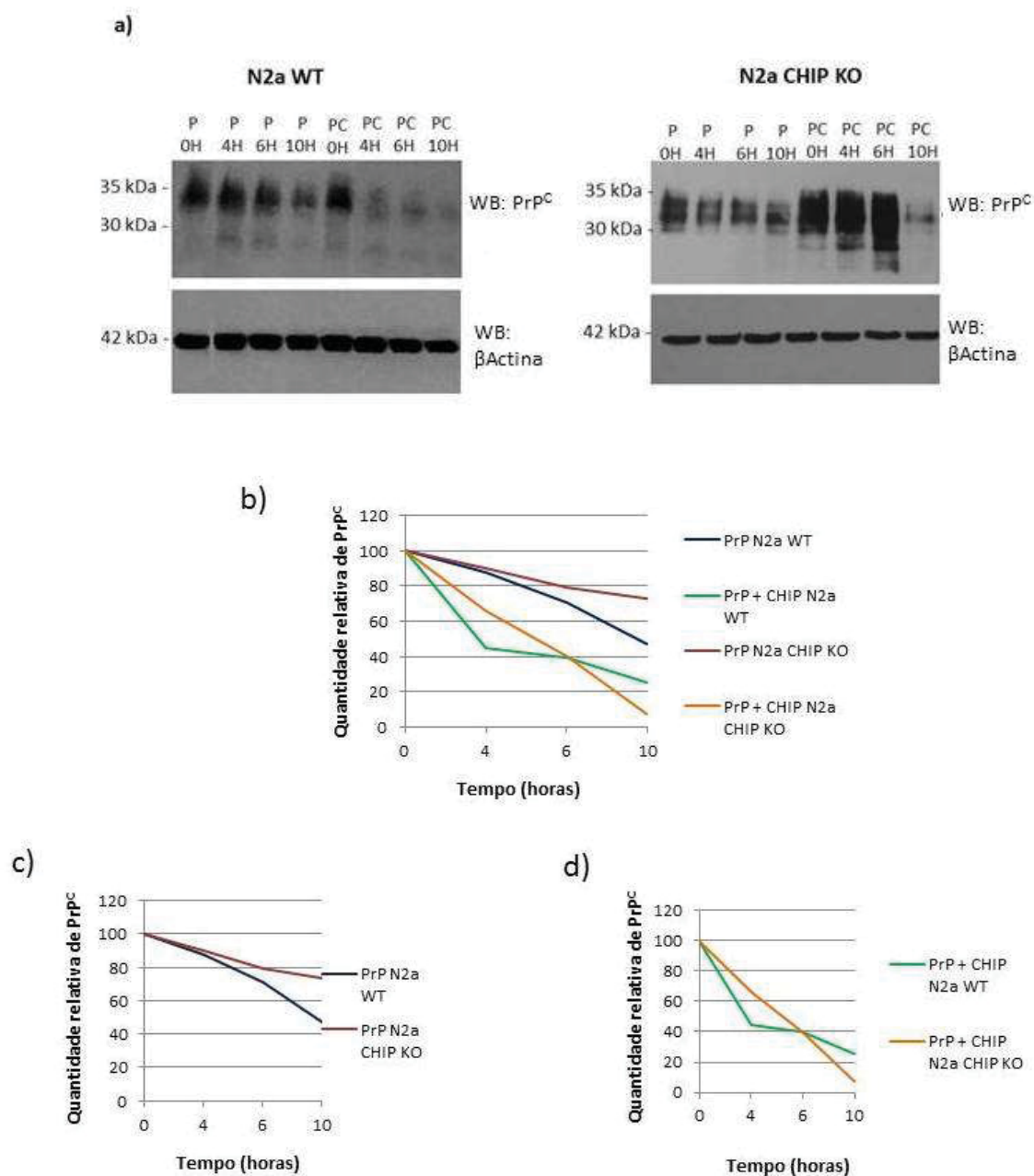
KO: (nocaute)

FONTE: A AUTORA, 2019.

Neste experimento, foi utilizada a linhagem CHIP 1.3 nocaute para CHIP. Através da FIGURA 10, pode-se observar que a expressão da proteína está totalmente ausente, se comparada à expressão em uma linhagem selvagem. Assim, pudemos usar tais células nos experimentos de degradação utilizando cicloheximida.

Brevemente, células N2a selvagens ou nocauteadas para CHIP foram transfectadas somente com vetor que expressa PrP^C, ou co-transfectadas com vetores que expressam PrP^C + CHIP. Após 24 horas de expressão, as células foram tratadas com o inibidor de tradução proteica cicloheximida, e os lisados celulares obtidos em 0, 4, 6 e 10 horas após esse tratamento. Assim, a quantidade relativa de PrP^C pôde ser avaliada em cada condição.

FIGURA 11 – COMPARAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE PrP^{C} EM CÉLULAS QUE EXPRESSAM OU NÃO CHIP



(a) Células N2a selvagens (WT) ou nocaute para CHIP (KO) foram transfectadas com plasmídeo para expressar PrP^{C} (canaletas P) ou PrP^{C} + CHIP (canaletas PC), em placas de 35mm. As placas foram tratadas com cicloheximida e os lisados proteicos obtidos nas horas 0; 4; 6 and 10 após o tratamento. Os extratos foram então submetidos a SDS-PAGE e *western blotting* e analisados através dos anticorpos anti- PrP^{C} e anti- β -Actina. (b) Valores relativos de PrP^{C} foram quantificados através do software ImageJ® e normalizados com relação às bandas de β -actina. (c) e (d) o gráfico da figura b foi desmembrado para cada condição de transfecção, sendo c a condição de transfecção das células somente com PrP^{C} e d a condição onde há co-expressão de PrP^{C} e CHIP.

Eixo X: tempo para obtenção dos lisados celulares.

Eixo Y: Quantidade relativa de PrP^{C} presente nos lisados.

WB: *western blotting*.

FONTE: A AUTORA, 2019.

Nas células selvagens, pode-se observar que, na condição onde há co-transfecção de PrP^C e CHIP, a degradação de PrP^C dá-se mais rápido do que na ausência de superexpressão de CHIP, corroborando resultados anteriores do grupo (RICHTER, 2015) e apontando para a hipótese de uma função de CHIP na estabilidade de PrP^C. Nesta condição, a presença de CHIP no sistema estaria provocando uma degradação mais rápida de PrP^C. (FIGURAS 11a e 11b).

Nas células nocaute para CHIP, quando se observa a condição onde há somente superexpressão de PrP^C, a quantidade da proteína mantém-se inalterada por mais tempo quando comparada a células selvagem só transfectadas para a expressão de PrP^C e que expressam CHIP endógena. Novamente, um papel importante de CHIP sobre estabilidade de PrP^C pode ser inferido, pois na sua ausência, PrP^C é menos degradada, ou degradada mais lentamente. Pode-se observar que, em até 10 horas pós-tratamento, a quantidade de PrP^C presente no extrato não diminuiu nem pela metade do que havia na hora 0. Já nas células selvagens, onde há expressão endógena de CHIP, PrP^C é degradado de tal forma que seus níveis relativos caem para aproximadamente 40% da quantidade inicial (FIGURA 11b).

Na FIGURA 11c, onde é possível comparar a condição de superexpressão somente de PrP^C nas duas linhagens testadas, é notável a diferença no tempo de degradação da proteína entre N2a selvagem e N2a CHIP KO. Na ausência de CHIP, a degradação de PrP^C é reduzida.

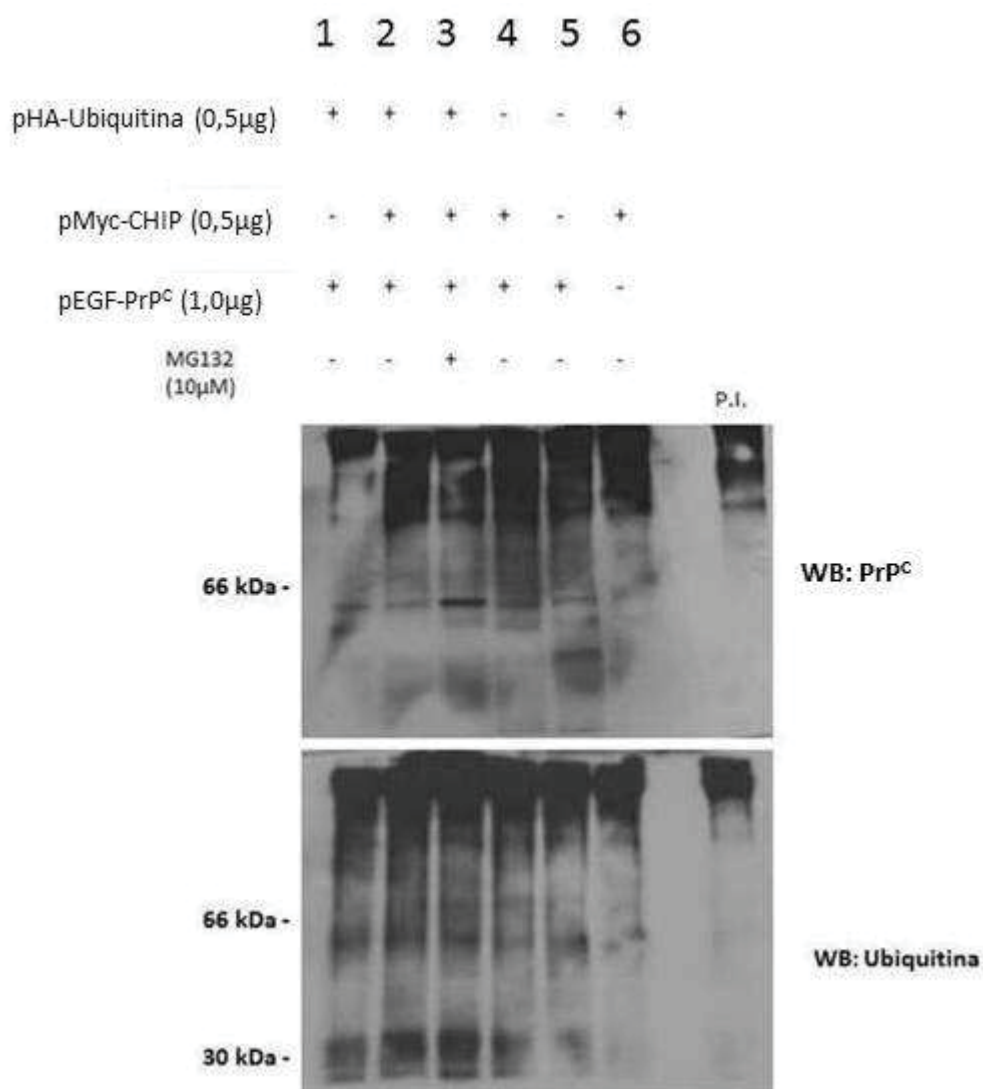
No entanto, nas células contendo co-expressão de PrP^C e CHIP, a quantidade de PrP^C, embora permaneça praticamente inalterada até a hora 6 pós tratamento com cicloheximida, sofre uma queda brusca na hora 10h. A demora da degradação de PrP^C, se comparada às células selvagens na mesma condição, pode ser explicada pela combinação de CHIP endógena e superexpressa nesta última, que pode provocar uma degradação mais acelerada de PrP (FIGURA 11d).

A análise desses resultados indica que CHIP está envolvida na degradação de PrP^C, e esse mecanismo foi melhor explorado nos experimentos a seguir.

6.1.6 Caracterização da Interação entre PrP^C e CHIP – Ensaio de Ubiquitinação

Com o objetivo de avaliar a via da ação de CHIP sobre PrP^C, realizou-se um ensaio de ubiquitinação, baseado no protocolo de Ding e Goldberg (2007). Juntando-se os resultados de degradação de PrP^C por CHIP (RICHTER, 2015) com o fato da propriedade de E3 ligase de CHIP (CONNELL, *et al.*, 2001; HATAKEYAMA *et al.*, 2001), mais o dado de PrP^C ser uma proteína passível de ubiquitinação e degradação via ubiquitina-proteassomo (MA e LINDQUIST, 2001; YEDIDIA *et al.*, 2001), é lógico supor que esse seja o mecanismo de ação de CHIP sobre PrP^C. Essa hipótese foi testada a seguir.

FIGURA 12 - CHIP É CAPAZ DE UBIQUITINAR PRP^C ATRAVÉS DA VIA DE UBIQUITINA-PROTEASSOMO



Da esquerda para a direita, as colunas de 1-6 foram co-transfectadas com os construtos indicados, em células N2a, em placas de cultivo de 35mm. Na coluna 3, MG132 foi adicionada ao meio, numa concentração final de 10 µM, por um período de 6 horas anteriores à lise celular. Após um período de 24 horas, os lisados foram imunoprecipitados, utilizando-se anticorpo anti-PrP^C policlonal ou soro pré-imune de camundongo (PI). As proteínas co-precipitadas foram analisadas utilizando-se anticorpo anti-Ubiquitina (painel inferior). A mesma membrana foi retestada com anticorpo anti-PrP^C (painel superior) para confirmar que PrP^C foi precipitado na reação de IP.

WB: *western blotting*.

FONTE: A autora, 2019.

Como observado na FIGURA 12, no painel superior, testado com anticorpo anti-PrP^C, há maior expressão de GFP-PrP^C na coluna 3, condição onde há co-expressão das proteínas ubiquitina, PrP^C e CHIP. O acúmulo de PrP^C deve-se à incubação com MG132, que é um inibidor

do proteassomo. Assim, a proteína não pode ser degradada por essa via. No painel inferior, testado com anticorpo anti-ubiquitina, da mesma forma, há maior acúmulo de proteínas ubiquitinadas, tanto na altura de 66kDa, que é a massa esperada para GFP-PrP^C, quanto na altura de 35kDa, que é a massa do PrP^C endógeno, abundante na linhagem N2a. A partir dessas observações, inferimos que, nessas condições, a via de degradação de PrP^C é a de ubiquitina-proteassomo.

Comparando-se as colunas 1 e 2, nas quais a diferença está na ausência ou presença de CHIP, respectivamente, pode-se observar uma menor expressão de GFP-PrP^C na coluna 2, quando observamos o painel superior. Este fato evidencia a ação de degradação específica de CHIP sobre PrP^C. Pelo contrário, quando analisamos a mesma coluna no painel inferior, há grande quantidade de proteínas ubiquitinadas na altura tanto de PrP^C superexpresso (66kDa) quanto da proteína endógena (~35kDa), quase na mesma quantidade da coluna 3, apontando que PrP^C é um substrato para CHIP, no que diz respeito a sua função de E3 ligase.

Nas outras condições: ausência de superexpressão de ubiquitina (coluna 4), somente expressão de GFP-PrP^C (coluna 5) e ausência de superexpressão de PrP^C (coluna 6), não há o mesmo efeito observado na coluna 3, apontando para a importância de que todas as proteínas devem estar presentes, para que ocorra ubiquitinação de GFP-PrP^C, através de CHIP, e seu acúmulo, com o uso de MG132.

A última coluna representa o controle negativo da reação, na condição em que o extrato celular foi incubado com matriz ligada a soro pré-imune de camundongo. A ausência de bandas nessa coluna valida os resultados nas outras colunas.

6.2 ENSAIOS COM PRP CITOSÓLICO

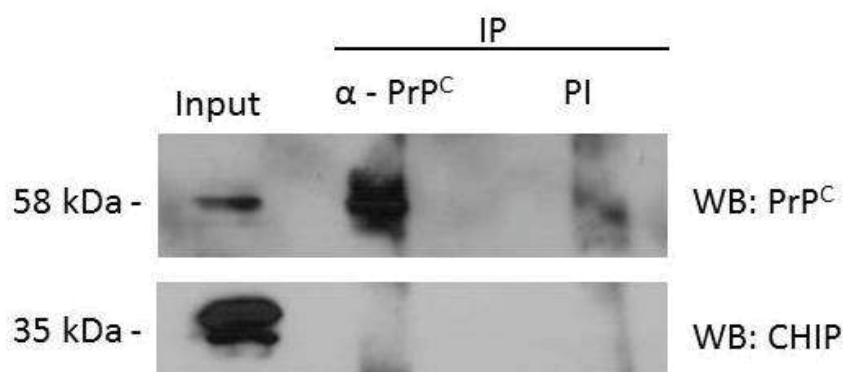
A decisão de incluir a investigação de CHIP sobre uma forma citosólica de PrP (Cyt-PrP) veio a partir do fato de CHIP ser uma proteína predominantemente citoplasmática (BALLINGER et al., 1999; DICKEY et al., 2007; SUN et al., 2013). Sendo assim, é razoável supor que sua interação com PrP ocorra com formas citosólicas da proteína.

Além disso, dados obtidos a partir de ensaios de viabilidade celular em nosso grupo mostraram que Cyt-PrP pode causar neurotoxicidade, e CHIP seria capaz de reverter essa toxicidade (XAVIER, 2017). Esse resultado corrobora o trabalho de Rambolt e colaboradores (2006), que correlaciona a toxicidade causada por uma forma de prion citosólico com sua localização, e aponta para um papel protetor das chaperonas, neste contexto.

6.2.1 Investigação da interação entre CHIP e PrP citosólico – Cyt-PrP

Em primeiro lugar, decidimos investigar se haveria interação física direta entre CHIP prion citosólico. Para isso, usamos a superexpressão de uma forma da proteína prion que não possui o peptídeo N-terminal (Cyt-PrP); portanto, o polipeptídeo sintetizado não é endereçado ao retículo endoplasmático, e permanece no citosol. Células N2a foram co-transfectadas com Myc-CHIP e Cyt-PrP e seus extratos imunoprecipitados com anticorpo anti-PrP^C. A FIGURA 13 mostra que, apesar de Cyt-PrP ter sido eficientemente imunoprecipitado, não foi possível detectar a presença de CHIP no complexo, sugerindo que, nas condições desse ensaio, essa interação não ocorre.

FIGURA 13 – CHIP NÃO INTERAGE COM CYT-PRP



Extratos de células N2a supreeexpressando GFP-Cyt-PrP e pMyc-CHIP foram imunoprecipitados com anticorpo anti-PrP^C ou soro pré-imune de camundongo (PI). A co-precipitação de CHIP foi analisada através de anticorpo anti-CHIP (painel superior). As mesmas membranas foram submetidas à incubação com anticorpo anti-PrP^C (painel inferior) para confirmar que prion citosólico foi precipitado durante a reação.

IP: Imunoprecipitação.

INPUT: Extrato pré-imunoprecipitação.

WB: *Western blotting*.

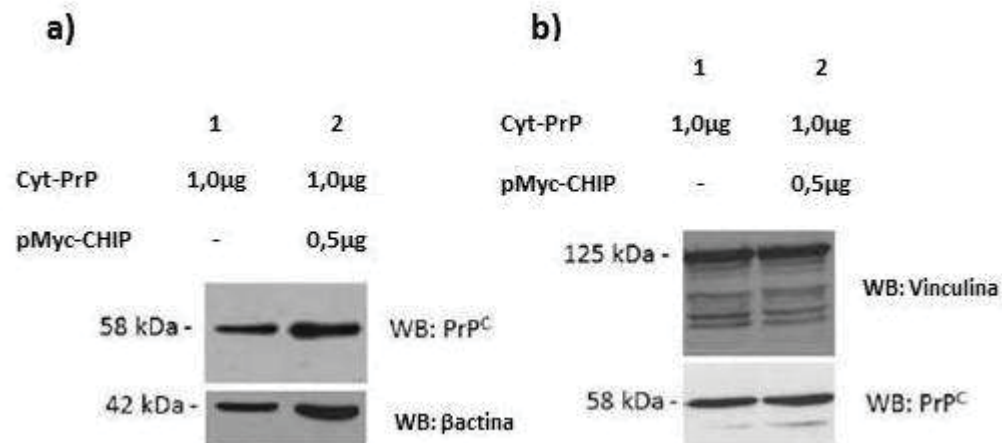
FONTE: A AUTORA, 2019.

Este foi um resultado não esperado, pois a hipótese era que CHIP, por ser uma proteína predominantemente citosólica (BALLINGER *et al.*, 1999; DICKEY *et al.*, 2007; SUN *et al.*, 2013), interagisse com formas de prion presentes neste compartimento celular. No tópico discussão, levantamos a hipótese de que a ausência de detecção de interação pode ser explicada devido ao metabolismo da molécula de Cyt-PrP expressa pelo plasmídeo pEGFP-PrP^{C*}.

6.2.2 Ensaio de Degradação

Embora não houvesse evidência de interação direta entre Cyt-PrP e CHIP, foram feitos experimentos de degradação, repetindo as condições testadas com GFP-PrP^C durante o meu mestrado (RICHTER, 2015), porém empregando-se o plasmídeo Cyt-PrP (Lee *et al.*, 2001). Estes testes foram realizados para avaliar uma possível ação indireta de CHIP sobre o PrP citosólico.

FIGURA 14 – AÇÃO DE CHIP SOBRE ESTABILIDADE/DEGRADAÇÃO DE CYT-PRP



(a) células HEK293T foram transfectadas com Cyt-PrP^C somente ou co-transfectadas com Myc-CHIP em placas de 35mm. (b) células N2a foram transfectadas com Cyt-PrP^C somente ou co-transfectadas com pMyc-CHIP em placas de 35mm. O vetor vazio pcDNA3.1-Myc foi utilizado para normalizar a quantidade total de DNA transfectada, em ambas as linhagens celulares (dado não mostrado na figura). Após 24 (b) ou 48 (a) horas, os lisados celulares foram submetidos à SDS-PAGE e *western blotting* e analisados utilizando-se anticorpos anti-PrP^C, anti-CHIP e anti-βactina ou anti-vinculina.

WB: *Western blotting*.

FONTE: A AUTORA, 2019.

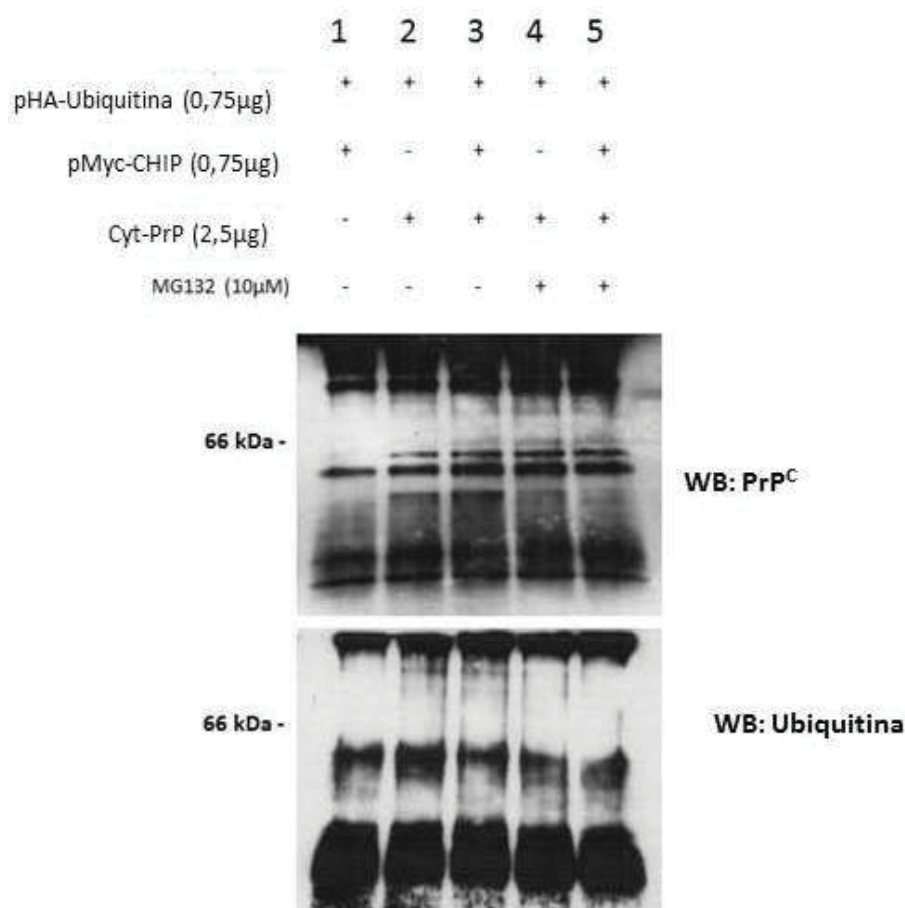
Interessantemente, não é possível observar nenhuma mudança na estabilidade de Cyt-PrP superexpressa tanto em células HEK293T (FIGURA 14a), quanto em N2a, na presença de CHIP (FIGURA 14b). Da mesma forma que para a ausência de interação direta no experimento de co-IP, a ausência de detecção de degradação pode ser explicada levando-se em consideração o metabolismo da molécula de Cyt-PrP expressa pelo plasmídeo pEGFP-PrP^C*

6.2.3 Investigação da Ação de CHIP Sobre Cyt-PrP – Ensaio de Ubiquitinação

Apesar de não haver evidências de interação física entre Cyt-PrP e CHIP, resolvemos investigar se não poderia haver uma ação indireta de CHIP sobre prion citosólico, e qual via estaria envolvida nesse processo. Para tanto, foi realizado ensaio de imunoprecipitação de

extratos, de células N2a co-transfectadas com Cyt-PrP, HA-ubiquitina e Myc-CHIP. O padrão de ubiquitinação e os níveis de expressão de Cyt-PrP foram analisados. Como indicado na FIGURA 15, CHIP parece não exercer nenhuma ação sobre a ubiquitinação de Cyt-PrP, visto que, quando as células co-expressam Cyt-PrP, Myc-CHIP e HA-ubiquitina, não há maior ubiquitinação de prion citosólico, se comparado às outras condições. Além disso, o tratamento das células com MG132 não causou maior acúmulo aparente de Cyt-PrP (colunas 4 e 5), indicando que o sistema ubiquitina-proteassomo não está envolvido nesse contexto celular.

FIGURA 15 – CHIP NÃO É CAPAZ DE UBIQUITINAR CYT-PRP



Células N2a foram co-transfectadas com os vetores indicados nas colunas 1-5, em placas de 35mm. As células nas colunas 4 e 5 foram tratadas com 10 µM MG132 por 16 horas anteriores à lise celular. Após 24 horas, os extratos celulares foram imunoprecipitados com anticorpo anti-PrP^C. O material co-precipitado foi analisado com anticorpo anti-ubiquitina (painel inferior). A mesma membrana foi submetida à incubação com anticorpo anti-PrP^C (painel superior), para confirmar que PrP^C foi precipitado durante a reação.

WB: *western blotting*.

FONTE: A AUTORA, 2019.

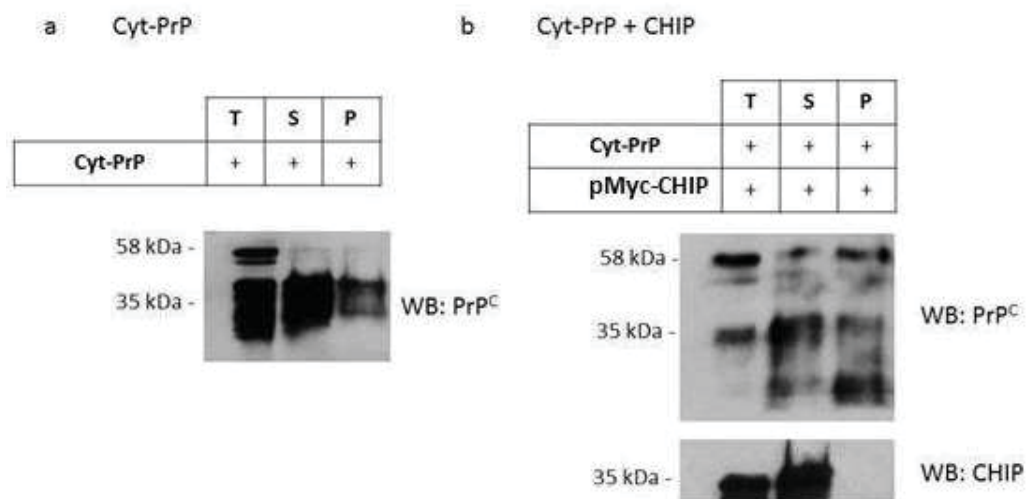
Mais uma vez, as diferenças estruturais entre os prions citosólicos gerados fisiologicamente e o Cyt-PrP utilizado em nossos experimentos também podem explicar este resultado.

6.2.4 Investigação da Ação de CHIP Sobre Cyt-PrP – Ensaio de Solubilidade e Precipitação em Metanol

Até agora, nossos resultados mostraram que não há interação entre CHIP e Cyt-PrP e que CHIP não é capaz de degradar Cyt-PrP. Além disso, aparentemente o sistema ubiquitina-proteassomo não está envolvido nesse contexto.

No entanto, ainda tentamos elucidar o mecanismo pelo qual CHIP está efetuando reversão de neurotoxicidade causada por Cyt-PrP (XAVIER, 2017) , através de ensaios de solubilidade e precipitação em metanol.

FIGURA 16 – AÇÃO DE CHIP SOBRE A SOLUBILIDADE DE CYT-PRP



Células N2a foram transfectadas com vetor que superexpressa Cyt-PrP (a) ou co-transfectadas com vetor que expressam CHIP (b). O vetor vazio pcDNA3.1-Myc foi utilizado para normalizar a quantidade total de DNA transfectada (dado não mostrado na figura). Após 24 horas, os extratos celulares foram preparados, frações sobrenadante e *pellet* foram separadas e precipitadas com metanol. As frações foram então submetidas à SDS-PAGE e *western blotting* e analisadas com os anticorpos anti-PrP^C e anti-CHIP.

T: Extrato total

S: Fração sobrenadante

P: Fração *pellet* - insolúvel

WB: *western blotting*.

FONTE: A AUTORA, 2019.

Se a teoria de CHIP estar atuando como chaperona sobre Cyt-PrP estivesse certa, esta favoreceria seu dobramento correto. Assim, esperávamos que, quando Cyt-PrP e CHIP estivessem juntas, a solubilidade do prion citosólico fosse maior que quando este estivesse sozinho. Interessantemente, o resultado obtido mostra o contrário, como indica a FIGURA 16. A FIGURA 16a indica que, em células N2a, embora as bandas estejam bastante sutis, a quantidade total de Cyt-PrP (na altura de 58 kDa) está quase igualmente dividida entre sua forma solúvel (fração sobrenadante – S) e sua forma insolúvel (fração P- insolúvel). Ao que a figura mostra apenas uma parte pequena a mais se apresenta solúvel. Quanto ao PrP^C endógeno, a maior parte presente na célula está no sobrenadante, ou seja, solúvel. A FIGURA 16b mostra o mesmo experimento, porém com co-transfecção de Cyt-PrP e CHIP. Neste caso, a maior parte da proteína superexpressa apresenta-se no *pellet* (fração insolúvel). Tanto PrP^C endógeno quanto CHIP continuam predominantemente no sobrenadante (fração solúvel).

7. DISCUSSÃO

7.1 EFEITO DE CHIP SOBRE PRP^C

O estudo da já confirmada interação PrP^C-CHIP (GIMENEZ, 2015) é um passo importante no entendimento não apenas da função fisiológica desta ligação em si, mas também uma possibilidade de achar novos meios de investir na modulação da estabilidade de PrP^C, através do estudo de seu controle de qualidade. Nesta questão da modulação está o principal foco deste trabalho.

Nosso primeiro objetivo foi averiguar quais seriam os domínios participantes da interação PrP^C-CHIP, através dos experimentos de *pull-down*. Os domínios mais relevantes da molécula de PrP^C, e mais usualmente descritos em suas interações estão na porção N-terminal da molécula. Por exemplo, a ligação com HSPG/GAG, dá-se através dos resíduos 23-52, 23-93 e 110-128; a ligação com LRP1, nos resíduos 23-107; a ligação com vitronectina (HAJJ *et al.*, 2007), do 105-129, a interação com STI1 entre 113-128. (Revisado por MARTINS *et al.*, 2010). Inclusive, pelo fato de STI1 e CHIP serem proteínas que compartilham a função de co-chaperona e apresentam homologia, considerávamos possível que a ligação de PrP^C com CHIP se desse através dos mesmos domínios. Essa possibilidade foi excluída após análise dos nossos testes. Aliás, toda a parte N-terminal de PrP^C aparentemente não é importante para que aconteça sua ligação a CHIP.

A partir desses resultados, foi necessário construir outras proteínas recombinantes de PrP^C, contendo várias deleções ao longo da molécula, inclusive em sua parte C-terminal, para avaliar se é esta a região de interesse para que haja ligação entre PrP^C-CHIP. Esses mutantes foram construídos, pelo aluno de iniciação científica Bruno Nakayabu (2017). Porém, não foi possível purificar quantidade suficiente de proteína recombinante para que os testes de *pull-down* fossem realizados.

Assim, novos experimentos testando diferentes mutantes de deleção de ambas as proteínas se fazem necessários, para a solução dessa dúvida.

Apesar do mapeamento dos domínios de interação ser uma informação valiosa e fornecer pistas para o seguimento do estudo, talvez mais importante seja avaliar qual a função fisiológica dessa ligação.

Com relação ao efeito do silenciamento de CHIP em células HEK293T e N2a através RNAs de interferência, o resultado foi surpreendente, já que o silenciamento não provocou mudanças aparentes no metabolismo de PrP^C.

Por um lado, esperávamos encontrar uma quantidade maior de PrP^C nas células que têm expressão de CHIP suprimida, já que nossos dados prévios apontam que a segunda é capaz de degradar a primeira. Por outro lado, quando falamos de uma proteína tão complexa e envolvida direta ou indiretamente em tantos processos celulares quanto à proteína prion celular (revisado por CASTLE e GILL, 2017), não podemos esperar que esta fosse regulada somente de uma forma e por uma única proteína. Assim, esse resultado pode ser coerente, se levarmos em consideração as inúmeras interações que a proteína prion celular faz, nos diversos contextos e complexos multiproteicos, além de seu complicado sistema de controle de qualidade. O silenciamento de uma única proteína que é passível de fazer modulação de PrP^C (CHIP, no caso) pode não ter sido suficiente para desestabilizá-la, nas nossas condições experimentais. Isto é, PrP^C pode apresentar um mecanismo de controle celular muito bem equilibrado, para que as quantidades presentes da proteína não perturbem a homeostase na célula.

No entanto, é importante frisar que diferentemente das linhagens de N2a nocauteadas para CHIP usadas neste trabalho, o silenciamento através de RNAs de interferência envolve mais passos, e expõe as células a mais estresse, através das transfecções. Além disso, o silenciamento, apesar de se mostrar satisfatoriamente eficiente nas diferentes condições testadas, é um mecanismo transiente; ou seja, após um determinado período de tempo, as células voltam a expressar

CHIP, pois o silenciamento não se dá no DNA das células. É possível que essas perturbações celulares, somadas ao silenciamento apenas temporário possam ter provocado desfechos para os experimentos diferentes do que aconteceriam endogenamente. Dessa forma, optamos por utilizar, posteriormente, as células nocautes para CHIP, a fim de obtermos resultados mais aproximados do que ocorrem endogenamente e assim avaliar o efeito sobre a estabilidade de PrP^C, item discutido a seguir.

Nossos experimentos de análise da degradação com cicloheximida (utilizando células nocaute para CHIP) e de ubiquitinação mostram claramente que CHIP possui um papel na estabilidade/degradação de PrP^C, além de sugerir que o sistema de UPS está envolvido nesse complexo, possibilidade bem razoável, levando-se em consideração por um lado, o metabolismo da proteína prion celular, e por outro, as funções já atribuídas a CHIP.

Os experimentos com cicloheximida mostram principalmente que a ausência de CHIP na célula promove a estabilidade prolongada de PrP^C, colocando a E3 ligase como uma das responsáveis pelo controle de qualidade da proteína prion celular. Além disso, os experimentos de ubiquitinação sugerem, através da análise qualitativa de proteínas ubiquitinadas e da inibição do proteassomo, que a via de ação de CHIP sobre PrP^C é a via UPS.

Apesar das várias evidências, para esgotar o tema seria necessário testar vias de degradação alternativas, como a lisossomal/autofágica, importante no metabolismo de PrP^C e também realizadas por CHIP, pois para um mesmo substrato, CHIP pode usar as duas vias de degradação. Inclusive, dados indicam que quando uma via é prejudicada, CHIP alterna a via de metabolismo de suas proteínas clientes (revisado por JOSHI *et al.*, 2016). Se pensarmos no contexto das doenças priônicas, que conseguem driblar o sistema UPS (DERIZIOTIS *et al.*, 2011), investigar a via lisossomal seria um caminho lógico a seguir.

Ainda, a despeito de estarem presentes no complexo CHIP-PrP^C (indicado nos experimentos de *pull-down*), não foi possível determinar o papel de STI1 e das chaperonas nesse complexo.

Além dos nossos experimentos, outros trabalhos publicados nos dão fortes motivos para acreditar que CHIP e STI1 possuem papéis muito bem definidos na modulação de PrP^C. Por exemplo, além do trabalho de Muller e colaboradores (2013) já citado na revisão deste trabalho, CHIP e STI1 participam juntas no contexto de câncer colorretal: CHIP atua neste contexto com propriedades supressoras de tumor, enquanto a superexpressão de STI1 em células proliferativas produz estabilização de suas proteínas clientes, através da ação excessiva de Hsp90 (RUCKOVA *et al.*, 2012).

Segundo a literatura, as co-chaperonas STI1 e CHIP interagem tanto com Hsp90 quanto com Hsp70 através dos mesmos motivos TPR e a natureza dessas interações é competitiva. A competição pelos domínios de ligação em Hsp70 ou Hsp90 determina a função das chaperonas, ou seja: se há ligação com CHIP, as proteínas-alvo são direcionadas para a via de degradação; se há ligação com STI1, os substratos proteicos são encaminhados para o dobramento correto e protegidos de degradação (STANKIEWICZ *et al.*, 2010; ASSIMON *et al.*, 2015).

Ainda mais, no que diz respeito especificamente às chaperonas, estudos mostram que Hsp90 e Hsp70 também possuem papéis essencialmente opostos na triagem de proteínas mal dobradas. Hsp70 promove ubiquitinação do substrato, enquanto Hsp90 inibe essa ubiquitinação. Tanto que, inibidores de Hsp90, como a geldanamicina, previnem a formação de agregados proteicos em modelos de doenças neurodegenerativas, como Parkinson, Huntington e atrofia muscular bulbar e espinhal, mostrando-se como uma possibilidade terapêutica no controle dessas doenças (Revisado por PRATT *et al.*, 2010).

Com relação aos prions, um recente trabalho realizou a superexpressão de proteínas de controle de qualidade na tentativa de desestabilizar PrP^{Sc} (THAPA *et al.*, 2018). Foi mostrado que um

mecanismo de controle de qualidade prejudicado influencia diretamente na propagação de prions. Do contrário, a superexpressão de ERp57 (proteína de controle de dobramento proteico) e VIP36 (proteína de transporte) é capaz de reduzir significativamente a quantidade de PrP^{Sc} em neuroblastomas infectados com prion, além de diminuir a atividade de “*seeding*” e da formação de moléculas de PrP^{Sc} *de novo*.

Mais recentemente, Mays e colaboradores (2019) demonstraram que em animais nocautes para Hsp70, a progressão de doença priônica foi significativamente acelerada, isto é, o período de incubação foi diminuído, e progressão clínica muito mais rápida, comparado a animais selvagens.

Nesse sentido, um possível desdobramento dessa tese seria testar se a superexpressão de CHIP seria capaz de reduzir a formação de PrP^{Sc} e avaliar o papel das Hsps nesse contexto.

Por hora, apenas indicamos que CHIP é capaz de atuar desestabilizando PrP^C, pelo fato de atuar em seu controle de qualidade, porém ainda não temos pistas sobre essa ação sobre a estabilidade de formas mal dobradas - “*scrapie like*” - de PrP. De qualquer forma, é provável que essa modulação de CHIP sobre a proteína prion celular selvagem possa ser usada, em longo prazo, na terapêutica contra as TSEs. Isso porque uma grande quantidade de evidências aponta para o fato de que PrP^C tem duas funções, por si só, nas doenças priônicas: ser substrato para a replicação de PrP^{Sc}, além de um mediador de sua toxicidade (STINCARDINI *et al.*, 2017). Além disso, é muito difícil desenvolver drogas que atuem diretamente em PrP^{Sc}, devido a heterogeneidade de suas variantes conformacionais. PrP^C torna-se, assim, um alvo alternativo no tratamento dessas doenças. De fato, alguns compostos têm como alvo o PrP^C. Por exemplo, o tetrapirrol catiônico estudado por Massignan e colaboradores (2016) pode produzir o efeito duplo de interferir na replicação de prions e inibir sua neurotoxicidade. Outro grupo sugeriu que a clorpromazina (CPZ), uma droga há muito tempo utilizada como antipsicótica, poderia também ser usada no tratamento para as TSEs. Neste contexto, a CPZ liga-se a PrP^C, inibindo indiretamente a replicação de prions (STINCARDINI *et al.*,

2017). Mesmo não tendo propriedades semelhantes a CHIP, nem atuando pelos mesmos mecanismos que esta age sobre PrP^C, faz-se importante saber que compostos como os citados acima são promissores no tratamento das doenças priônicas, tendo como alvo terapêutico PrP^C, e não PrP^{Sc}, aumentando assim as possibilidades de desenvolvimento de novas abordagens no tratamento das TSEs. Da mesma maneira, a modulação que CHIP exerce na estabilidade e degradação de PrP^C pode se tornar uma dessas possibilidades futuras.

7.2 EFEITO DE CHIP SOBRE CYT-PRP

Levando-se em consideração resultados anteriores do nosso grupo que apontaram, através de experimentos de viabilidade celular, para um efeito neurotóxico de Cyt-PrP e uma possível reversão desse efeito através da superexpressão de CHIP e STI1 (XAVIER, 2017), resolvemos investigar mais a fundo como se daria esse efeito de CHIP sobre a forma citosólica da proteína prion.

Muitas evidências contrastantes são geradas a respeito do papel dos prions citosólicos nas doenças priônicas. Diferentes trabalhos conferem às formas citosólicas de PrP papéis de proteção ou toxicidade. Esse debate é recorrente entre os autores, e essas propriedades antagônicas parecem ser fatores dependentes da linhagem celular e níveis de expressão testados. Inclusive, Song e colaboradores (2013) discorrem num trabalho de revisão sobre isoformas menores da proteína prion que nem as formas citosólicas de prion, nem sua forma transmembrana são intrinsecamente citotóxicas, mas essas atribuições são criticamente dependentes do contexto celular.

Curiosamente, analisando resultados gerados em nossas condições experimentais, CHIP de nenhuma forma interagiu com o Cyt-PrP (ensaio de co-IP), nem influenciou em sua degradação, além da via de ubiquitina-proteassomo não estar envolvida nesse contexto (experimentos de degradação e de ubiquitinação). Porém, podemos explicar esses achados levando-se em consideração a estrutura e

metabolismo de Cyt-PrP. Essa proteína não possui os aminoácidos 1-23, que representa o peptídeo sinal que endereça o polipeptídeo ao retículo endoplasmático (Lee *et al.*, 2001). Fisiologicamente, essa estrutura não existe. De acordo com a literatura, durante a síntese de PrP^C, formas citosólicas da proteína podem ser formadas de duas formas distintas: quando esta é endereçada ao retículo endoplasmático, onde é reconhecida como um polipeptídeo mal dobrado pelo ERAD (degradação associada ao retículo endoplasmático). A partir daí, a molécula é retrotranslocada para o citosol e degradada via ubiquitina-proteassomo (RESELLI *et al.*, 2010); ou em casos nos quais o peptídeo sinal N-terminal falha no endereçamento da molécula ao retículo endoplasmático. Dessa forma, o polipeptídeo permanece no citosol e mantém sua sequência sinal (FIORITI *et al.*, 2005; ORSI *et al.*, 2006). Nessas duas situações, o prion citosólico gerado é diferente do Cyt-PrP empregado em nossos experimentos, tanto com relação à sua estrutura, como quanto à sua biossíntese. A diferença na sequência da proteína superexpressa pode explicar a variação em seu metabolismo e a perda da afinidade por CHIP, já que o peptídeo sinal de PrP^C não apenas modula o processo de translocação na célula, mas também influencia a topologia do polipeptídeo nascente (TATZELT e WINKLHOFER, 2004).

Nos experimentos de degradação, Cyt-PrP não teve sua estabilidade alterada na presença de CHIP superexpressa. Além da hipótese da diferença de estrutura e metabolismo entre Cyt-PrP e prions citosólicos endógenos já citada anteriormente, haveria também a possibilidade de CHIP exercer sobre Cyt-PrP ubiquitinação não canônica, como mencionada por Ronnebaum e colaboradores (2013). Neste trabalho, os autores indicam que CHIP estaria na verdade protegendo sua proteína-alvo, provocando sua ubiquitinação e estabilização, e evitando sua degradação proteassomal por outra ubiquitina-ligase. Este seria um mecanismo indireto de proteção. No nosso contexto, CHIP estaria estabilizando Cyt-PrP, através da degradação de outra ubiquitina-ligase capaz de degradar PrP^C, como a gp78, já descrita como E3-ligase específica para a proteína prion (SHAO

et al., 2014). Essa proteção serviria para impedir que uma proteína com função fisiológica fosse indevidamente degradada. Essa hipótese foi refutada mais adiante, através do experimento de ubiquitinação, pois CHIP superexpressa não foi capaz de aumentar a ubiquitinação de Cyt-PrP.

Ainda, uma terceira linha de pensamento sugere que CHIP esteja exercendo sobre Cyt-PrP somente sua função intrínseca de chaperona, e não de E3-ligase, função essa já apontada por Rosser e colaboradores (2007). Este estudo mostrou que a degradação proteassomal nem sempre é o desfecho provocado pela ubiquitinação por CHIP.

Apesar de todos esses resultados, podemos ainda supor que CHIP possa agir indiretamente sobre Cyt-PrP. Dessa forma, CHIP não interage diretamente ou degrada essa forma de prion, mas, ao invés disso, age como uma proteína de suporte capaz de disparar vias de sinalização que alcançam o Cyt-PrP de outras formas, que não o sistema de ubiquitina-proteassomo. Por exemplo, se CHIP agisse como chaperona sobre Cyt-PrP, esta poderia modular o dobramento correto de Cyt-PrP, ao invés de marcá-lo para posterior degradação, com o objetivo de manter a homeostase celular (ROSSER *et al.*, 2007).

Por isso, mesmo não havendo evidências de interação direta, degradação e ubiquitinação de Cyt-PrP por CHIP, ainda tentamos elucidar o mecanismo pelo qual CHIP provoca reversão de neurotoxicidade causada por Cyt-PrP (XAVIER, 2017), através do experimento de solubilidade e precipitação em metanol. Este teste foi realizado na intenção de detectar um possível aumento da solubilidade de prion citosólico por CHIP.

Embora preliminar, o ensaio mostrou, interessantemente, que a presença de CHIP parece ter tornado Cyt-PrP mais insolúvel. Correlacionando esses dados com os dados de viabilidade celular do nosso grupo (XAVIER, 2017), questionamos como a proteção gerada por CHIP, quando esta reverte a neurotoxicidade causada por Cyt-PrP pode ser atrelada ao fato de esta tornar Cyt-PrP mais insolúvel. Alguns trabalhos mostram que a presença de CHIP está relacionada ao aumento da solubilidade de seus substratos (MILLER *et al.*, 2005;

SAHARA *et al.*, 2005). Porém, há também evidências que a superexpressão de CHIP provoca um aumento na insolubilidade de seus substratos (PETRUCELLI *et al.*, 2004; CHOI *et al.*, 2007), como no nosso contexto. Inclusive, Choi e colaboradores (2007) discorrem sobre a possibilidade de CHIP aumentar a insolubilidade de seu substrato (ataxina-1) para sequestrá-la em agregados e impedir seu acesso a outras proteínas celulares essenciais, impedindo assim o aparecimento de prejuízos causados pela citotoxicidade.

De fato, em cultivos celulares, quando a produção de proteínas mal dobradas excede a capacidade de redobramento das chaperonas e da degradação via UPS, essas proteínas aberrantes são ativamente transportadas a uma estrutura citoplasmática chamada agressomo. A formação de agressomos é reconhecida por ser uma resposta citoprotetora, capaz de sequestrar proteínas mal dobradas e potencialmente tóxicas (pela tendência à agregação) e facilitar sua eliminação por autofagia (OLZMANN *et al.*, 2008; PARK *et al.*, 2018).

Com relação aos prions, Dubnikov e colaboradores (2016) usaram a inibição de chaperonas ciclofilinas, responsáveis por dobramento proteico, e causaram a formação de agressomos contendo proteína prion. PrPs mal dobrados passaram pelo ER, como sítio de triagem, para serem direcionados aos agressomos. Ao final do estudo, indicaram que os agressomos de PrP são centros de depósito citosólico que trabalham em conjunto com o controle de qualidade do ER para manter sua homeostase.

Do outro lado da interação, a propósito, CHIP já foi apontada como sendo participante na formação de agressomos. No estudo realizado por Sha e colaboradores (2009), CHIP promove a ubiquitinação e degradação via proteassomal de iNOS, bem como seu sequestro para dentro de agressomos. A presença de CHIP é essencial para que estruturas pré-agressomo se transformem num agressomo maduro. Além disso, CHIP também é necessária para que a forma mutante do regulador transconductância de fibrose cística (CFTR Δ F508) seja endereçada aos agressomos.

Assim sendo, podemos encontrar no estudo do envolvimento de CHIP na formação de agressomos contendo PrPs um ponto muito interessante, embora extenso e complexo, na investigação da interação dessas duas proteínas.

Fechando esse tópico, mesmo que as diferenças estruturais entre Cyt-PrP utilizados nos experimentos e prions citosólicos gerados endogenamente possam ser um motivo para a falta de interação entre esta e CHIP, não podemos excluir a possibilidade de que o citosol não é o local de encontro entre CHIP e PrP^C pois, apesar de CHIP estar majoritariamente neste compartimento celular, ela também pode atuar sobre substratos em outros locais, inclusive a membrana (revisado por JOSHI *et al.*, 2016). Para que essa dúvida fosse sanada, seria necessário padronizar experimentos de imunofluorescência e co-localização. Outra alternativa seria realizar experimento de centrifugação diferencial e testar os diferentes compartimentos celulares, para a presença de PrP^C e CHIP.

8. CONCLUSÃO

Através deste trabalho, foi possível estudar algumas particularidades da interação entre PrP^C e CHIP.

Foi visto que CHIP não interage com o domínio N-terminal de PrP^C, indicando que o sítio de ligação encontra-se provavelmente na região C-terminal da molécula.

Ainda, sugerimos que CHIP é capaz de degradar PrP^C, contudo isso não acontece com a forma citosólica testada em nossos experimentos (Cyt-PrP).

Além disso, CHIP parece realizar a ubiquitinação de PrP^C, mas não provoca o mesmo efeito em Cyt-PrP.

Para a forma citosólica de PrP, ainda indicamos que CHIP parece deixá-la mais insolúvel, relacionando CHIP com a possível formação de agregados contendo PrPs mal dobrados.

Em vista desses resultados, a realização deste trabalho nos possibilitou inferir uma clara ação de CHIP sobre PrP^C, colocando assim a E3 ligase numa posição promissora, no que diz respeito à modulação da estabilidade da proteína prion celular. Essa modulação, se bem estabelecida e controlada, em longo prazo pode ser uma alternativa na busca por tratamentos contra as doenças priônicas, visto que até o momento os indivíduos acometidos pelas TSEs não dispõem de nenhuma abordagem efetiva.

Além disso, o entendimento dos eventos que envolvem metabolismo e controle de qualidade de PrP pode também auxiliar na melhor compreensão de outras doenças neurodegenerativas mais prevalentes, tais como Parkinson e Alzheimer, uma vez que os mecanismos nestas últimas apresentam pontos em comum com as doenças causadas por prions.

9. PERSPECTIVAS

Como futuras direções desse trabalho, intencionamos concluir os testes sobre a determinação dos domínios importantes na interação PrP^C-CHIP, através do uso de mutantes de deleção (tanto de PrP^C quanto de CHIP). Ainda, será de primordial importância estudar o envolvimento e papel das chaperonas Hsp70/90, além de STI1, neste complexo.

Além disso, será interessante estudar através de ensaios de imagem - co-localização, e/ou de compartimentalização celular – centrifugação diferencial, a localização celular exata da interação PrP^C-CHIP.

O foco do presente trabalho foi investigar a ação de CHIP sobre PrP^C através do sistema UPS. Porém, para uma melhor compreensão dessa ação, seria necessário avaliar outras vias, como a lisossomal/autofágica, através da marcação de endossomos e vacúolos autofágicos, por exemplo.

Finalmente, uma ramificação importante do projeto seria avaliar as ações de CHIP sobre formas mal dobradas de PrP. Para tanto, utilizaríamos vetores capazes de expressar mutantes de PrP^C, com mutações conhecidas relacionadas a doenças priônicas, construídos por Machado e colaboradores (2012). Assim, seria possível avaliar uma possível ação de CHIP sobre essas proteínas mutadas, as quais apresentam estruturas mais semelhantes ao *scrapie*.

REFERÊNCIAS

AL-RAMAHI, I.; LAM, Y.C.; CHEN, H.K.; DE GOUYON, B., ZHANG, M.; PÉREZ, A.M.; BRANCO, J.; DE HARO, M.; PATTERSON, C.; ZOGHBI, H.Y.; BOTAS, J. CHIP protects from the neurotoxicity of expanded and wild-type ataxin-1 and promotes their ubiquitination and degradation. **The journal of biological chemistry**, vol. 281, no. 36, pp. 26714–26724, 2006.

ARAVIND, L.; KOONIN, E.V. The U box is a modified RING finger - a common domain in ubiquitination. **Curr Biol**, vol.10, no.4, 2000.

ASSIMON, V.A.; SOUTHWORTH, D.R.; GESTWICKI, J.E. Specific binding of tetratricopeptide repeat (TPR) proteins to heat shock protein 70 (Hsp70) and heat shock protein 90 (Hsp90) is regulated by affinity and phosphorylation. **Biochemistry**, vol. 54, no. 48, pp 7120–7131, 2015.

BALLINGER, C.A.; CONNELL, P.; WU, Y., HU, Z.; THOMPSON, L.J.; YIN, L.Y.; PAT-TERSON, C. Identification of CHIP, a novel tetratricopeptide repeat-containing protein that interacts with heat shock proteins and negatively regulates chaperone functions. **Molecular and cellular biology**.vol. 19, no.6, pp 4535-4545, 1999.

BENDHEIM, P.E.; BROWN, H.R.; RUDELLI, R.D.; SCALA, L.J.; GOLLER, N.L.; WEN, G.Y.; KASCSAK, R.J.; CASHMAN, N.R.; BOLTON, D.C. Nearly ubiquitous tissue distribution of the scrapie agent precursor protein. **Neurology**.Vol. 42, no.1, pp 149-156, 1992.

BOLTON, D.C.; MCKINLEY, M.P.; PRUSINER S.B. Identification of a protein that puri-fies with the scrapie prion. **Science**, vol 218, pp 1309-1311, 1982.

BÜELER, H.; AGUZZI, A.; SAILER, A.; GREINER, R.A.; AUTENRIED, P.; AGUET, M.; WEISSMANN, C. Mice devoid of PrP are resistant to scrapie. **Cell**, vol 73, no 7, Pages 1339–1347, 1993.

BÜELER, H.; FISCHER, M.; LANG, Y.; BLUETHMANN, H., LIPP, H.P.; DEARMOND, S.J.; PRUSINER, S.B.; AGUET, M.; WEISSMANN, C. Normal development and behavior of mice lacking the neuronal cell-surface PrP protein. **Nature**, vol. 356, pp 577-582, 1992.

CHAKRABARTI, O.; ASHOK, A., HEGDE, R.S. Prion protein biosynthesis and its emerging role in neurodegeneration.**Trends Biochem Sci**. vol. 34, no. 6, pp 287-95, 2009.

CHIARINI, L.B.; FREITAS, A.R.; ZANATA, S.M.; BRENTANI, R.R.; MARTINS, V.R.; LINDEN, R. Cellular prion protein transduces neuroprotective signals. **EMBO Journal**, vol. 21, no. 13, pp 3317–3326, 2002.

CONNELL, P.; BALLINGER, C.A.; JIANG, J.; WU, Y.; THOMPSON, L.J.; HÖHFELD, J.; PATTERSON, C. The co-chaperone CHIP regulates protein triage decisions mediated by heat-shock proteins. **Nat Cell Biol** vol. 3, no. 1, pp 93-96, 2001.

COSTA, M.D.M.; PALUDO, K.S.; KLASSEN, G.; LOPES, M.H.; MERCADANTE, A.F.; MARTINS, V.R.; CAMARGO, A.A.; NAKAO, L.S.; ZANATA, S.M. Characterization of a specific interaction between ADAM23 and cellular prion protein, **Neuroscience Letters** vol.461, no. 1, pp 16-20, 2009.

DAI, Q.; ZHANG, C.; WU, Y.; MCDONOUGH, H.; WHALEY, R. A.; GODFREY, V.; PATTERSON, C. CHIP activates HSF1 and confers protection against apoptosis and cellular stress. **The EMBO Journal**, vol. 22, no. 20, pp 5446–5458, 2003.

DANTUMA, N.P.; BOTT, L.C. The ubiquitin-proteasome system in neurodegenerative diseases: precipitating factor, yet part of the solution. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 29, no 3, pp 633–658, 2016.

DAS, A.S.; ZOU, W. Prions: Beyond a Single Protein **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 29, no. 3, pp 633–658, 2016.

DERIZIOTIS, P.; ANDRÉ, R.; SMITH, D.M.; GOOLD, R.; KINGHORN, K.J.; KRISTIANSEN, M.; NATHAN, J.A.; ROSENZWEIG, R.; KRUTAUZ, D.; GLICKMAN, M.H.; COLLINGE, J.; GOLDBERG, A.L.; TABRIZI, S.J. Misfolded PrP impairs the UPS by interaction with the 20S proteasome and inhibition of substrate entry. **The EMBO Journal**, vol. 30, no. 15, pp 3065–3077, 2011.

DE SOUZA, L.E.; MOURA COSTA, M.D.; BILEK, E.S.; LOPES, M.H.; MARTINS, V.R.; PÜSCHEL, A.W.; MERCADANTE, A.F.; NAKAO, L.S.; ZANATA, S.M.; STI1 antagonizes cytoskeleton collapse mediated by small GTPase Rnd1 and regulates neurite growth. **Exp Cell Res.** vol. 324, no.1, pp 84-91, 2014.

DICKEY, C.A.; PATTERSON, C.; DICKSON, D.; PETRUCCELLI, L. Brain CHIP: removing the culprits in neurodegenerative disease. **Trends Mol Med.**, vol.13, no.1, pp 32-38, 2007.

DING, X.; GOLDBERG, M.S. Regulation of LRRK2 stability by the E3 ubiquitin ligase CHIP. **PLoS One**, vol. 106, no. 8, pp 2897-2902, 2009.

DUBNIKOV, T.; BEN-GEDALYA, T.; REINER, R.; HOEPFNER, D.; CABRAL, W.A.; MARINI, J.C.; COHEN, E. PrP-containing aggresomes are cytosolic components of an ER quality control mechanism. **J Cell Sci.**, vol. 129, no. 19, pp 3635–3647, 2016.

EDKINS, A.L. CHIP: A Co-chaperone for Degradation by the Proteasome. **Subcell Biochem.**, vol 78, pp 219-242, 2015.

FIORITI, L.; DOSSENA, S.; STEWART, L.R.; STEWART, R.S.; HARRIS, D.A.; CHIESA, R. Cytosolic prion protein (PrP) is not toxic in N2a cells and primary neurons expressing pathogenic PrP mutations. **J Biol Chem** vol. 280, no. 12, pp 11320–11328, 2005.

GIMENEZ, A.P.L.; RICHTER, L.M.L.; ATHERINO, M.C.; BEIRÃO, B.C.; FÁVARO, C. JR; COSTA, M.D.; ZANATA, S.M.; MALNIC, B.; MERCADANTE, A.F. Identification of novel putative-binding proteins for cellular prion protein and a specific interaction with the STIP1 homology and U-Box-containing protein 1. **Prion**. Vol. 9, no. 5, pp 355-366, 2015.

GIMENEZ, A.P.L. **Identificação e caracterização de interações realizadas pela proteína prion celular no sistema olfatório.** Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

GOOLD, R.; MCKINNON, C.; TABRIZI, S.R. Prion degradation pathways: Potential for therapeutic intervention **Mol Cell Neurosci**, vol. 66, pp 12–20, 2015.

HAJJ, G.N.; ARANTES, C.P.; DIAS, M.V.; ROFFÉ, M., COSTA-SILVA, B.; LOPES, M.H.; PORTO-CARREIRO, I.; RABACHINI, T.; LIMA, F.R.; BERALDO, F.H.; PRADO, M.A.; LINDEN, R.; MARTINS, V.R. The unconventional secretion of stress-inducible protein 1 by a heterogeneous population of extracellular vesicles. **Cell Mol Life Sci**. Vol.70, no.17, pp 3211-3227, 2013.

HAJJ, G.N.; LOPES, M.H.; MERCADANTE, A.F.; VEIGA, S.S.; DA SILVEIRA, R.B.; SANTOS, T.G.; RIBEIRO, K.C.; JULIANO, M.A.; JACCHIERI, S.G.; ZANATA, S.M.; MARTINS, V.R.; Cellular prion protein interaction with vitronectin supports axonal growth and is compensated by integrins, **J Cell Sci**. Vol. 120, pp1915-26, 2007.

HARLOW, E.; LANE, D. **Antibodies: a laboratory manual** 1 ed. Cold Spring Harbor Laboratory:USA. 1998.

HATAKEYAMA, S.; YADA, M.; MATSUMOTO, M.; ISHIDA, N.; NAKAYAMA, K.I.; U box proteins as a new family of ubiquitin-protein ligases. **J BiolChem** vol. 276, no.35, pp 33111-33120, 2001.

HEAD, M.W.; RITCHIE, D.; SMITH, N.; MCLOUGHLIN, V.; NAILON, W.; SAMAD, S.; MASSON, S.; BISHOP, M.; MCCARDLE, L.; IRONSIDE, J.W. Peripheral tissue involvement in sporadic, iatrogenic, and variant Creutzfeldt-Jakob disease. **Am J Pathol**.Vol.164, no.1, pp 143-153, 2004.

IMAI, Y.; SODA, M.; HATAKEYAMA, S.; AKAGI, T.; HASHIKAWA, T.; NAKAYAMA, K.I.; TAKAHASHI, R. CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. **Mol Cell.**, vol. 10, no. 1, pp 55-67, 2002.

JOSHI, V.; AMANULLAH, A.; UPADHYAY, A.; MISHRA, R.; KUMAR, A.; MISHRA, A. A Decade of Boon or Burden: What Has the CHIP Ever Done for Cellular Protein Quality Control Mechanism Implicated in Neurodegeneration and Aging? **Front Mol Neurosci.**, vol. 4, pp 9-93, 2016.

IRONSIDE, J.W.; RITCHIE, D.L.; HEAD, M.W. **Prion diseases Handbook of Clinical Neurology**, vol. 145, G.G. Kovacs and I. Alafuzoff, Editors, India, 2018.

KO, H.S.; BAILEY, R.; SMITH, W.W.; LIU, Z.; SHIN, J.H.; LEE, Y.I.; ZHANG, Y.J.; JIANG, H.; ROSS, C.A.; MOORE, D.J.; PATTERSON, C.; PETRUCCELLI, L.; DAWSON, T.M.; DAWSON, V. CHIP regulates leucine-rich repeat kinase-2 ubiquitination, degradation, and toxicity. **PNAS**. vol. 106, no. 8, pp 2897-2902, 2009.

SATPUTE-KRISHNAN, P.; AJINKYA, M.; BHAT, S.; ITAKURA, E.; HEGDE, R.S.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. ER Stress-Induced Clearance of Misfolded GPI-Anchored Proteins via the Secretory Pathway **Cell**, vol. 158, no. 3, pp 522–533, 2014.

KRAMMER, C.; SCHATZL, H.M.; VORBERG, I. Prion-like propagation of cytosolic protein aggregates: Insights from cell culture models **Prion**, vol. 3, no. 4, pp 206-212, 2009.

KUMAR, P.; AMBASTA, R.K.; VEERESHWARAYYA, V.; ROSEN, K.M.; KOSIK, K.S.; BAND, H.; MESTRIL, R.; PATTERSON, C.; QUERFURTH, H.W. CHIP and HSPs interact with beta-APP in a proteasome-dependent manner and influence Abeta metabolism. **Hum Mol Genet**. Vol.16, no.7, pp 848-864, 2007.

KUNDRAT, L.; REGAN, L.; Balance between folding and degradation for Hsp90-dependent client proteins: a key role for CHIP. **Biochemistry** vol. 49, no.35, pp 7428–7438, 2010.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, vol. 227, no. 5259, pp 680-685, 1970.

LAWSON, V.A.; COLLINS, S.J.; MASTERS, C.L.; HILL, A.F. Prion protein glycosylation **Journal of Neurochemistry**, vol. 93, pp 793–801, 2005.

LEE, K.S.; MAGALHÃES, A.C.; ZANATA, S.M.; BRENTANI, R.R.; MARTINS, V.R.; PRADO, M.A.M. Internalization of mammalian fluorescent cellular prion protein and N-terminal deletion mutants in living cells. **Journal of Neurochemistry**. Vol. 79, no. 1, pp 79-87, 2001.

LIMA, F.R.; ARANTES, C.P.; MURAS, A.G.; NOMIZO, R.; BRENTANI, R.R.; MARTINS, V.R.; Cellular prion protein expression in astrocytes modulates neuronal survival and differentiation. **J Neurochem**. Vol. 103, no.6, pp 2164-2176, 2007.

LIN, Z.; ZHAO, D.; YANG, L. Interaction between misfolded PrP and the ubiquitin-proteasome system in prion-mediated neurodegeneration. **Acta Biochim Biophys Sin**, vol. 45, no. 6, pp 477-48, 2013.

LINDEN, R.; MARTINS, V.R.; PRADO, M.A.M.; CAMMAROTA, M.; IZQUIERDO, I. BRENTANI, R.R. Physiology of the prion protein. **Physiology Reviews**, vol.88, no.2, pp 673-728, 2008.

LOPES, M.H.; HAJJ, G.N.; MURAS, A.G.; MANCINI, G.L.; CASTRO, R.M.; RIBEIRO, K.C.; BRENTANI, R.R.; LINDEN, R.; MARTINS, V.R. Interaction of cellular prion and stress-inducible protein 1 promotes neuritogenesis and neuroprotection by distinct signaling pathways. **J Neurosci.**, vol. 25, no. 49. pp 11330-11339, 2005.

LOVE, I.M.; GROSSMAN, S.R. It Takes 15 to Tango: Making Sense of the Many Ubiquitin Ligases of p53. **Genes Cancer**. Vol.3, pp 249-263, 2012.

MA, J.; LINDQUIST, S. De novo generation of a PrP^{Sc}-like conformation in living cells. **Nat Cell Biol.**, Vol. 1 no. 6, pp 358-361, 1999.

MA, J.; LINDQUIST, S. Wild-type PrP and a mutant associated with prion disease are subject to retrograde transport and proteasome degradation. **Proc Natl Acad Sci U S A** vol.98. no.26, pp 14955–14960, 2001.

MA, J.; WOLLMANN, R.; LINDQUIST, S. Neurotoxicity and neurodegeneration when PrP accumulates in the cytosol. **Science** vol. 298, pp1781–1785, 2002.

MABBOTT, N.A., ALIBHAI, J.D.; MANSON, J. The role of the immune system in prion infection. **Handb Clin Neurol.**, vol. 153, pp 85-107, 2018.

MACHADO, C.F.; BERALDO, F.H.; SANTOS, T.G.; BOURGEON, D.; LANDEMBERGER, M.C.; ROFFÉ, M.; MARTINS, V.R., Disease-associated Mutations in the Prion Protein Impair Laminin-induced Process Outgrowth and Survival, **The Journal of Biological Chemistry**, vol.287, no. 52, pp 43777-43788, 2012.

MACIEJEWSKI, A.; OSTAPCHENKO, V.G.; BERALDO, F.H.; PRADO, V.F.; PRADO, M.A.M.; CHOY, W.Y. Domains of STIP1 responsible for regulating PrPC-dependent amyloid- β oligomer toxicity. **Biochemical Journal**. Vol. 473, no. 14, pp 2119-2130, 2016.

MARTINS, V.R.; BERALDO, F.H.; HAJJ, G.N.; LOPES, M.H.; LEE, K.S.; PRADO, M.M.; LINDEN, R. Prion protein: orchestrating neurotrophic activities. **Curr Issues Mol Biol**. Vol.12, no.2, pp 63-86, 2010.

MARTINS, V.R.; GRANER, E.; GARCIA-ABREU, J.; DE SOUZA, S.J.; MERCADANTE, A.F.; VEIGA, S.S.; ZANATA, S.M.; NETO, V.M.; BRENTANI, R.R. Complementary hydropathy identifies a cellular prion protein receptor. **Nat Med**. Vol.3, pp 1376-82, 1997.

MASSIGNAN, T.; CIMINI, S.; STINCARDINI, C.; CEROVIC, M.; VANNI, I.; ELEZGARAI, S.R.; MORENO J.; STRAVALACI, M.; NEGRO, A.; SANGIOVANNI, V.; RESTELLI, E.; RICCARDI, G.; GOBBI, M.; CASTILLA, J.; BORSELLO, T.; NONNO, R.; BIASINI, E. A cationic tetrapyrrole inhibits toxic activities of the cellular prion protein. **Sci Rep.**, vol. 15, pp 6-23, 2016.

MAYS, C.E.; ARMIJO, E.; MORALES, R.; KRAMM, C.; FLORES, A.; TIWARI, A.;BIAN, J.;TELLING, G.C.;PANDITA, T.K.; HUNT, C.R.; SOTO, C. Prion disease is accelerated in mice lacking stress-induced heat shock protein 70 (HSP70) **J Biol Chem.**, [Epub ahead of print], 2019.

MEYER, R.F.; MCKINLEY, M.P.; BOWMAN, K.A.; BRAUNFELD, M.B.; BARRY, R.A.; PRUSINER, S.B. Separation and properties of cellular and scrapie prion proteins. **ProcNatlAcadSci U S A** vol.83, no.8, pp 2310-2314, 1986.

METZGER, M.B.; HRISTOVA, V.A.; WEISSMAN, A.; HECT and RING finger families of E3 ubiquitin ligases at a glance. **J Cell Sci.**, vol. 1, no. 125, pp 531-537, 2012

MIN, J.N.; WHALEY, R.A.; SHARPLESS, N.E.; LOCHYER, P.; PORTBURY, A.L.; PATTERSON, C. CHIP Deficiency Decreases Longevity, with Accelerated Aging Phenotypes Accompanied by Altered Protein Quality Control. **Molecular And Cellular Biology** vol. 28, no.12, pp 4018-4025, 2008

MORALES, R. Prion strains in mammals: Different conformations leading to disease. **PLoS Pathogens**, vol. 13, no. 7, pp 1-5, 2017.

MORISHIMA, Y., WANG, A. M., YU, Z., PRATT, W. B., OSAWA, Y., & LIEBERMAN, A. P. CHIP deletion reveals functional redundancy of E3 ligases in promoting degradation of both signaling proteins and expanded glutamine proteins. **Human Molecular Genetics**, vol. 17 no. 2), pp 3942–3952, 2008.

MULLER, P.; RUCKOVA, E.; HALADA, P.; COATES, P.J.; HRSTKA, R.; LANE, D.P.; VOJTESEK, B. C-terminal phosphorylation of Hsp70 and Hsp90 regulates alternate binding to co-chaperones CHIP and HOP to determine cellular protein folding/degradation balances **Oncogene** vol.32, no.25, pp 3101-3110, 2013

NAKAYABU, B. **Expressão e Purificação de Domínios Estruturais da Proteína Prion Celular (PrP^C): Ferramentas para a Caracterização da Interação entre PrP^C e Stub1/Chip**, Monografia (graduação) - Setor de Ciencias Biológicas, Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2017.

NAKAYAMA, K.; TAKAHASHI, R. CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's Disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. **Molecular Cell**, Vol. 10, no. 1, pp 55–67, 2002.

OLZMANN, J.A.; LI, L.; CHIN, L.S. Aggresome Formation and Neurodegenerative Diseases: Therapeutic Implications. **Curr Med Chem.**, vol. 15, no. 1, pp 47–60, 2008.

ORSI, A.; FIORITI, L.; CHIESA, R.; SITIA, R. Conditions of endoplasmic reticulum stress favor the accumulation of cytosolic prion protein. **J BiolChem** vol.281, no.41, pp 30431–30438, 2006.

PAUL, I.; GOSH, M.K. The E3 Ligase CHIP: Insights into Its Structure and Regulation **Biomed Research International** vol. 2014; pp 2014:918183, 2014.

PARBACUS, M.K.; HOE, N.; SADEGHI, S.; PATTERSON, C.; WIERTZ, E.; CORREIA, M.A. CYP3A4 ubiquitination by gp78 (the tumor autocrine motility factor receptor, AMFR) and CHIP E3 ligases **Arch Biochem Biophys**. vol 483, no. 1, pp 66-74, 2009.

PARK, Y.; PARK, J.; KIM, Y.K. Crosstalk between translation and the aggresome–autophagy pathway. **Autophagy**, vol. 14, no. 6, pp 1079–1081, 2018.

PRATT, W.B.; MORISHIMA, Y.; PENG, H.M.; OSAWA, Y. Role of the Hsp90/Hsp70-Based Chaperone Machinery in Making Triage Decisions When Proteins Undergo Oxidative and Toxic Damage. **Exp Biol Med.**, vol. 235, no. 3, pp 278–289, 2010.

RAMBOLT, A.S.; MIESBAUER, M.; RAPAPORT, D.; BARTKE, T.; BAIER, M.; WINKLHOFFER, K.F.; TATZELT, J. Association of Bcl-2 with Misfolded Prion Protein Is Linked to the Toxic Potential of Cytosolic **Molecular Biology of the Cell**, vol. 17, pp 3356–3368, 2006.

RANEK, M.J.; STACHOWSKI, M.J.; KIRK, J.A.; WILLIS, M.S. The role of heat shock proteins and co-chaperones in heart failure. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, vol. 373, no. 1738, pp 1-18, 2018.

RESTELLI, E.; FIORITI, L.; MANTOVANI, S.; AIRAGHI, S.; FORLONI, G.; CHIESA, R. Cell type-specific neuroprotective activity of untranslocated prion protein. **PLoS One** vol.5, no.10, e13725, 2010.

RICHTER, L.M.L. **Caracterização do papel de Stub1/Chip no controle da estabilidade da proteína prion celular**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

RONNEBAUM, S.M.; WU, Y.; McDONOUGH, H.; PATTERSON, C. The Ubiquitin Ligase CHIP Prevents SirT6 Degradation through Noncanonical Ubiquitination. **Mol Cell Biol**, v. 33, n. 22, p. 4461–4472, 2013.

ROSSER, M.F.N.; WASHBURN, E.; MUCHOWSKI, P.J.; PATTERSON, C.; CYR, D.M. Chaperone functions of the E3 ubiquitin ligase CHIP. **The Journal of Biological Chemistry**. vol. 282, no. 31, pp. 22267–22277, 2007.

RUCKOVA, E.; MULLER, P.; NENUTIL, R.; VOJTESEK, B. Alterations of the Hsp70/Hsp90 Chaperone and the Hop/CHIP co-chaperone System In Cancer **Cellular & Molecular Biology Letters**, vol. 17, no. 3, pp 446–458, 2012.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2º ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SHA, Y.; PANDIT, L.; ZENG, S.; EISSA, T. A Critical Role for CHIP in the Aggresome Pathway. **Mol Cell Biol.**, vol. 2, no. 1, pp 116–128, 2009.

SHAO, J.; CHOE, V.; CHENG, H.; TSAI, Y.C.; WEISSMAN, A.M.; LUO, S.; RAO, H. Ubiquitin ligase gp78 targets unglycosylated prion protein PrP for ubiquitylation and degradation. **PLoS One**.Vol.9, no.4, e92290, 2014.

SONG, Z.; ZHAO, D.; YANG, L. Metabolism of minor isoforms of prion proteins: Cytosolic prion protein and transmembrane prion protein. **Neural Regen Res.**, vol. 8, no. 30, pp 2868–2878, 2013.

STANKIEWICZ, M.; NIKOLAY, R.; RYBIN, V.; MAYER, M.P. CHIP participates in protein triage decisions by preferentially ubiquitinating Hsp70-bound substrates. **FEBS Journal**, vol. 277, no. 16, pp 3353–3367, 2010.

STEELE, A.D.; LINDQUIST, S.; AGUZZI, A. The prion protein knockout mouse, a phenotype under challenge. **Prion**, vol.1, no.2, pp 83-93, 2007.

STINCARDINI, C.; MASSIGNAN, T.; BIGGI, S.; ELEZGARAI, S.R.; SANGIOVANNI, V.; VANNI, I.; PANCHER, M.; ADAMI, V.; MORENO, J.; STRAVALACI, M.; MAIETTA, G.; GOBBI, M.; NEGRO, A.; REQUENA, J.R.; CASTILLA, J.; NONNO, R.; BIASINI, E. An antipsychotic drug exerts anti-prion effects by altering the localization of the cellular prion protein **PLoS One**, vol.12, no. 8, PP1-27, 2017.

SUN C; LI, H.L.; SHI, M.L.; QING, H.L.; BAI, J.; ZHENG, J.N. Diverse roles of C terminal Hsp70 interacting protein (CHIP) in tumorigenesis. **J Cancer Res ClinOncol**. vol. 140, no.2, pp189-97, 2014

THAPA, S.; ABDULRAHMAN, B.; ABDELLAZIZ, D.H.; LU, L.; AISSA, M.B.; SCHATZ, H.M. Overexpression of quality control proteins reduces prion conversion in prion-infected cells, **J Biol Chem.**, vol. 293. no. 41, pp 16069–16082, 2018.

YANG, S.W.; OH, K.H.; PARK, E.; CHANG, H.M.; PARK, J.M.; SEONG, M.W.; KA, S.H.; SONG, W.K.; PARK, D.E.; BAAS, P.W.; JEON, W.J.; CHUNG, C.H. USP47 and C Terminus of Hsp70-Interacting Protein (CHIP) Antagonistically Regulate Katanin-p60-Mediated Axonal Growth. **The Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 31, p. 12728–12738, 2013.

YEDIDIA, Y.; HORONCHIK, L.; TZABAN, S.; YANAI, A.; TARABOULOS, A. Proteasomes and ubiquitin are involved in the turnover of the wild-type prion protein. **Embo J** vol.20, no.19, pp 5383–5391, 2001

ZANATA, S.M.; LOPES, M.H.; MERCADANTE, A.F.; HAJJ, G.N.; CHIARINI, L.B.; NOMIZO, R.; FREITAS, A.R.; CABRAL, A.L.; LEE, K.S.; JULIANO, M.A.; DE OLIVEIRA, E.; JACHIERI, S.G.; BURLINGAME, A.; HUANG, L.; LINDEN, R.; BRENTANI, R.R.; MARTINS, V.R. Stress-inducible protein 1 is a cell surface ligand for cellular prion that triggers neuroprotection. **EMBO J**. vol.21, no.13, pp3307-16, 2002.

ZHANG, J.; WANG, K.; GUO, Y.; SHI, Q.; TIAN, C.; CHEN, C.; GAO, C.; ZHANG, B.Y.; DONG, X.P. Heat shock protein 70 selectively mediates the degradation of cytosolic PrPs and restores the cytosolic PrP-induced cytotoxicity via a molecular interaction. **Virology** J. vol. 9:303, 2012. 2000 Feb 24;10(4):R132-4.